

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 38/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/43657 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01507 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. März 1998 (16.03.98) (30) Prioritätsdaten: 197 13 001.1 27. März 1997 (27.03.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAHLERT, Helga [DE/DE]; Walddörferstrasse 59, D-22041 Hamburg (DE). STÜWE, Hans-Thomas [DE/DE]; Ashausener Strasse 47, D-21435 Stelle (DE). FIEBIG, Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, D-21493 Schwarzenbek (DE). CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Lönshöhe 2, D-21465 Wentorf (DE). BECKER, Wolf-Meinhard [DE/DE]; Dorfstrasse 53, D-23975 Mözen (DE). BUFE, Albrecht [DE/DE]; Ottersbekallee 21, D-20255 Hamburg (DE). SCHRAMM, Gabriele [DE/DE]; Ahornweg 10, D-23867 Sülbfeld (DE). JÄGER, Lothar [DE/DE]; R.-Luxemburg-Strasse 34, D-07743 Jena (DE). MÜLLER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Brandströmstrasse 17, D-07749 Jena (DE).		(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; D-64271 Darmstadt (DE). (81) Bestimmungsstaaten: HU, JP, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: GRAMINAE POLLEN ALLERGEN MUTANTS FOR SPECIFIC IMMUNOTHERAPY, AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME (54) Bezeichnung: GRAMINAE POLLEN ALLERGEN MUTANTEN ZUR SPEZIFISCHEN IMMUNOTHERAPIE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to modified recombinant allergen mutants which can be obtained from recombinant allergens derived from allergens obtained by means of extraction from natural raw materials, such as the pollen of the species <i>Phelum pratense</i>. These modified recombinant allergens stimulate the lymphocytes of persons suffering from a pollen allergy to bring about proliferation and cytokine synthesis, but have a significantly reduced capacity to bond with the IgE antibodies contained in the serum of lymphocyte donors and with grass pollen allergen specific IgEs. The inventive modified recombinant allergens can therefore be used for a specific, individual allergy treatment.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft modifizierte rekombinante Allergenmutanten, die aus rekombinanten Allergenen, abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen, wie z.B. Pollen der Spezies <i>Phleum pratense</i> gewonnen werden können. Diese modifizierten rekombinanten Allergene stimulieren Lymphozyten von Pollenallergikern zur Proliferation und Zytokinsynthese, weisen jedoch mit den im Serum der T-Lymphozytenspender enthaltenen IgE-Antikörper sowie mit Graspollenallergen-spezifischen IgE eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit auf und sind daher für eine spezifische, maßgeschneiderte Allergie-Therapie verwendbar.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/ 415, A61K 39/36		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/43657
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01507		(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; D-64271 Darmstadt (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 16. März 1998 (16.03.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 13 001.1 27. März 1997 (27.03.97) DE		(81) Bestimmungsstaaten: HU, JP, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAHLERT, Helga [DE/DE]; Walddörferstrasse 59, D-22041 Hamburg (DE). STÜWE, Hans-Thomas [DE/DE]; Ashausener Strasse 47, D-21435 Stelle (DE). FIEBIG, Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, D-21493 Schwarzenbek (DE). CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Lönshöhe 2, D-21465 Wentorf (DE). BECKER, Wolf-Meinhard [DE/DE]; Dorfstrasse 53, D-23975 Mözen (DE). BUFE, Albrecht [DE/DE]; Ottersbekallee 21, D-20255 Hamburg (DE). SCHRAMM, Gabriele [DE/DE]; Ahornweg 10, D-23867 Sülffeld (DE). JÄGER, Lothar [DE/DE]; R.-Luxemburg-Strasse 34, D-07743 Jena (DE). MÜLLER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Brandströmstrasse 17, D-07749 Jena (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 21. Januar 1999 (21.01.99)	
(54) Title: GRAMINAE POLLEN ALLERGEN MUTANTS FOR SPECIFIC IMMUNOTHERAPY, AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME			
(54) Bezeichnung: GRAMINAE POLLEN ALLERGEN MUTANTEN ZUR SPEZIFISCHEN IMMUNOTHERAPIE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to modified recombinant allergen mutants which can be obtained from recombinant allergens derived from allergens obtained by means of extraction from natural raw materials, such as the pollen of the species <i>Phelum pratense</i>. These modified recombinant allergens stimulate the lymphocytes of persons suffering from a pollen allergy to bring about proliferation and cytokine synthesis, but have a significantly reduced capacity to bond with the IgE antibodies contained in the serum of lymphocyte donors and with grass pollen allergen specific IgEs. The inventive modified recombinant allergens can therefore be used for a specific, individual allergy treatment.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft modifizierte rekombinante Allergenmutanten, die aus rekombinanten Allergenen, abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen, wie z.B. Pollen der Spezies <i>Phelum pratense</i> gewonnen werden können. Diese modifizierten rekombinanten Allergene stimulieren Lymphozyten von Pollenallergikern zur Proliferation und Zytokinsynthese, weisen jedoch mit den im Serum der T-Lymphozytenspender enthaltenen IgE-Antikörper sowie mit Graspollenallergen-spezifischen IgE eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit auf und sind daher für eine spezifische, maßgeschneiderte Allergie-Therapie verwendbar.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Graminaenpollenallergenmutanten zur spezifischen Immuntherapie, deren Herstellung und Verwendung

- Die Erfindung betrifft modifizierte rekombinanten Allergene (mrA),
5 abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen
gewonnen werden können. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollenkörner
der Graminaen, wie z.B. *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylus*
glomerata, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a. .
- 10 Graminaenpollenextrakte, wie sie für diagnostischen und therapeutischen
Einsatz verwendet werden, bestehen aus einem heterogenen Gemisch
von Proteinen und Glykoproteinen, unter denen einige mit IgE-Antikörpern
von Allergikern reagieren und definitionsgemäß als Allergene bezeichnet
15 werden. Die molekularen Eigenschaften erlauben eine Klassifizierung in 6
Gruppen, wobei die Kreuzreaktivität der in Frage kommenden Graminaen-
Spezies relativ hoch ist. Die dominierenden Allergengruppen (Haupt-
allergene) sind die Gruppen 5 und 1, gemäß der üblichen Allergen-
Klassifizierung (Liebers et al., Clin. Exper. Allergy, 26, 494-516 (1996)).
Die N-terminalen Aminosäuresequenzen und/oder die partiellen oder
20 vollständigen deduzierten Aminosäuresequenzen der Gruppen 5 und 1 der
Hauptallergene sind bekannt (Vrtala et al., J. Immunology 151, 4773-4781
(1993) u. Bufe et al. FEBS. Lett. 263, 6-12 (1995)). Weiterhin gibt es
beschriebene Verfahren zur Klonierung dieser Hauptallergene (Scheiner et
al. Int. Arch Allergy Immunol. 98, 93-96 (1992)).
- 25 Gegenwärtig werden zur In-vitro-Diagnostik von Typ 1-Allergien wäßrige
Extrakte aus Graminaenpollen verwendet. Diese Extrakte sind auch die
Basis für die In-vitro-Diagnostik und zur anschließenden spezifischen
Immuntherapie (Fiebig H., Allergo Journal 7, 377-382 (1995)). Der Einsatz
30 von nativen Allergenextrakten zur spezifischen Immuntherapie wird durch
die dabei induzierten IgE-bedingten, allergischen Reaktionen (Neben-
reaktionen) begrenzt. Deshalb können native Allergenextrakte nur in
Dosierungen unterhalb der Nebenwirkungsschwelle appliziert werden. Um
die für den therapeutischen Effekt notwendigen hohen Allergen-
35 konzentrationen zu erreichen, werden die Extrakte durch mehrfache
aufeinanderfolgende Injektionen mit einer bis zur Erhaltungsdosis

ansteigenden Konzentration verabreicht. Durch Adsorption an Gele ist es möglich, Allergenextrakte nebenwirkungsärmer und effektiver zur Hyposensibilisierung zu verwenden.

5 Eine weitere Verbesserung konnte durch die chemische Modifizierung der Allergene zu Allergoiden, die eine verringerte IgE-Reaktivität bei weitgehend erhaltener Immunogenität besitzen, erzielt werden (Fiebig H., Allergo Journal 7, 377-382 (1995) u. Maasch et al. Clin. Ref. Allergy 5, 89-106 (1987)).

10 In ersten Untersuchungen mit Hausstaubmilbenallergenen gibt es Hinweise, daß durch gerichteten Aminosäureaustausch eine Reduzierung der IgE-Reaktivität erzielt werden kann (Smith et al. Mol. Immunol. 33, 399-405 (1996) u. Nishiyama et al. Mol. Immunol. 32, 1021-1029 (1995)).

15 Die etablierte Hyposensibilisierung von Graminaenpollenallergikern erfolgt momentan mit natürlichen Extrakten, die alle bekannten Allergene sowie nichtallergene, aber immunogene Begleitstoffe in beträchtlichen Konzentrationen enthalten, obwohl für die allergenspezifische Therapie
20 nur diejenigen Allergenmoleküle benötigt werden, gegen die der jeweilige Patient tatsächlich sensibilisiert ist. Das bedeutet, daß der Allergiker zwangsläufig mit Komponenten behandelt wird, die nicht zu seiner Hyposensibilisierung beitragen und Nebenwirkungen induzieren können.

25 Durch die Verfügbarkeit von modifizierten rekombinanten Allergenen können einzelne Allergene oder definierte Gemische für die Hyposensibilisierung entsprechend dem individuellen Sensibilisierungsspektrum als Arzneimittel eingesetzt werden.

30 Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer spezifischen, maßgeschneiderten Therapie.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen mit wertvollen Eigenschaften aufzufinden, insbesondere solche, die zur Herstellung
35 von Arzneimitteln verwendet werden können.

Es wurde gefunden, daß die Verbindungen der vorliegenden Erfindung in Form der modifizierten rekombinanten Allergene sowie ihre Salze und Solvate bei guter Verträglichkeit sehr wertvolle pharmakologische Eigenschaften besitzen. Vor allem wirken sie hyposensibilisierend.

5

Die Verbindungen können als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Therapie bei allergischen Erkrankungen und zur Hyposensibilisierung von Allergikern.

10

Überraschenderweise ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung gelungen, ausgehend von rekombinanten Allergenen, die mit den in natürlichen Extrakten vorkommenden Allergenmolekülen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz identisch sind, durch an sich bekannte gentechnische Verfahren, Mutanten zu konstruieren, die mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern spezifisch reagieren, d.h. zur Proliferation und Zytokinsynthese stimulieren oder eine Anergie induzieren, aber mit den im Serum der T-Lymphozytenspender enthaltenen IgE-Antikörper sowie mit Graspollenallergen-spezifischen IgE aus Seren von anderen Graspollenallergikern eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit aufweisen.

20

Dieser Effekt, der weder bei den natürlich vorkommenden noch bei den rekombinanten Allergenen auftritt, ist deshalb wünschenswert, weil

25

- die IgE-vermittelten Nebenwirkungen bei der Hyposensibilisierung vermieden oder zumindest stark reduziert werden,

- die Erkennung der modifizierten rekombinanten Allergene durch die TH-Gedächtnislymphozyten der Allergiker gewährleistet ist,

30

- damit Voraussetzung für die Normalisierung der beim Allergiker gestörten Balance der unterschiedlich differenzierten TH-Subpopulationen gegeben ist,

35

- die therapeutische Wirkung durch Anergisierung und/oder Eliminierung der allergenreaktiven T-Zellen sowie die funktionelle Umorientierung von einer TH2-dominierten zu einer TH0/TH1-ausgerichteten spezifischen T-Zell-Population möglich wird,

5 – die Regulation der Immunglobulinsynthese von der für den Allergiker typischen Bildung spez. IgE-Antikörper (TH2-kontrolliert) zur bevorzugten Synthese von IgG-Antikörpern (TH1-kontrolliert) erfolgen kann,

10 – und dadurch bei einer Behandlung mit den erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene eine deutliche Verbesserung des Befindens der Patienten zu erwarten ist.

15 Gegenstand der Erfindung sind modifizierte rekombinante Allergene, abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollenkörner der Graminaen, wie z.B. Phleum pratense, Lolium perenne Dactylus
20 glomerata, Poa pratensis, Cynodon dactylon, Holcus lanatus u.a. . Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung, modifizierte rekombinante Allergene, die sich von den Hauptallergenen der Gruppen 1-6 ableiten, wobei die Reaktivität dieser erfindungsgemäßen Allergene mit IgE-
25 Antikörpern von Graspollenallergikern eliminiert oder zumindest reduziert ist und die Reaktivität mit den T-Lymphozyten weiterhin erhalten ist. Die modifizierten rekombinanten Allergene unterscheiden sich vom Wildtyp dadurch, daß die Gene der Allergene durch gentechnische Verfahren so
30 modifiziert wurden, daß die von ihnen codierten Polypeptide Austausch, Deletionen und/oder Additionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Die dominierenden T-Zell-reaktive Bereiche der modifizierten rekombinanten Allergene (T-Zell-Epitope) werden dabei gentechnisch nicht verändert.

35 Vorzugsweise werden die modifizierten rekombinanten Allergene von den Hauptallergenen der Gruppe 5, aber auch von der Gruppe 1 abgeleitet. Insbesondere stammen die erfindungsgemäßen Allergene von dem Hauptallergen Phl p 5b ab.

35

- 5 -

Die Sequenz von Phl p 5b lautet gemäß dem Einbuchstabencode für Aminosäuren folgendermaßen :

```

5  ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK
    1          10          20          30          40          50
    FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV
    51          60          70          80          90          100
10  ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA
    101         110         120         130  140         150
    TAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA
    151         160         170         180  190         200
15  TVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG
    201         210         220         230         240         250
    AASGAATVAAGGYKV
    251         260  265
20

```

Die Erfindung betrifft insbesondere modifizierte rekombinante Allergene, in denen mindestens einer oder eine Kombinationen der Bereiche 16-42, 135-149 und 180-206 des aus insgesamt 265 Aminosäuren bestehenden Phl p 5b-Polypeptides nicht verändert werden. Die zu erhaltenen Abschnitte sind die T-Zell-Epitop-Bereiche.

Die genannten Aminosäurereste können auch derivatisiert sein. Insbesondere kommen hierbei Modifikationen der Seitenketten in Frage.

Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen von Aminosäureresten stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

35

	Ala = A	Alanin
	Asn = N	Asparagin
	Asp = D	Asparaginsäure
	Arg = R	Arginin
5	Cys = C	Cystein
	Gln = Q	Glutamin
	Glu = E	Glutaminsäure
	Gly = G	Glycin
	His = H	Histidin
10	Ile = I	Isoleucin
	Leu = L	Leucin
	Lys = K	Lysin
	Met = M	Methionin
	Phe = F	Phenylalanin
15	Pro = P	Prolin
	Ser = S	Serin
	Thr = T	Threonin
	Trp = W	Tryptophan
	Tyr = Y	Tyrosin
20	Val = V	Valin.

Ferner bedeuten nachstehend:

	Ac	Acetyl
25	BOC	tert.-Butoxycarbonyl
	CBZ oder Z	Benzyloxycarbonyl
	DCCl	Dicyclohexylcarbodiimid
	DMF	Dimethylformamid
	EDCI	N-Ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
30	Et	Ethyl
	FCA	Fluoresceincarbonsäure
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
35	Me	Methyl
	MBHA	4-Methyl-benzhydrylamin

- 7 -

	Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl-sulfonyl
	HONSu	N-Hydroxysuccinimid
	OBu	tert.-Butylester
	Oct	Octanoyl
5	OMe	Methylester
	OEt	Ethylester
	POA	Phenoxyacetyl
	Sal	Salicyloyl
	TFA	Trifluoressigsäure
10	Trt	Trityl (Triphenylmethyl).

Sofern die vorstehend genannten Aminosäuren in mehreren enantiomeren Formen auftreten können, so sind vor- und nachstehend alle diese Formen und auch ihre Gemische (z. B. die DL-Formen) eingeschlossen. Ferner können die Aminosäuren, z. B. als Bestandteil von Verbindungen mit entsprechenden an sich bekannten Schutzgruppen versehen sein.

In die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch sogenannte Prodrug-Derivate eingeschlossen, d. h. mit z. B. Alkyl- oder Acylgruppen, Zuckern oder Oligopeptiden abgewandelte Verbindungen der, die im Organismus rasch zu den wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen gespalten werden.

Hierzu gehören auch bioabbaubare Polymerderivate der erfindungsgemäßen Verbindungen, wie dies z. B. in Int. J. Pharm. 115, 61-67 (1995) beschrieben sind.

Die erfindungsgemäßen Allergene können ein oder mehrere chirale Zentren besitzen und daher in verschiedenen stereoisomeren Formen vorkommen. Die vorliegende Erfindung umschließt alle diese Formen.

Ganz besonders bevorzugt sind modifizierte rekombinante Allergene, die aus der folgenden Gruppe von Polypeptiden, abgeleitet von Phl p 5b, stammen:

35 PM1 (N³² → D, D⁴⁹ → L, K⁵⁰ → A)

- 8 -

PM2 ($D^{49} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$)PM3 ($A^{13} \rightarrow C$)DM1 ($\Delta K^{50} \rightarrow P^{\Delta 132}$, $D^{49} \rightarrow L$)DM 2 ($\Delta F^{51} - G^{178}$, $D^{49} - L$, $K^{50} - A$)5 DM2* ($\Delta F^{51} - G^{178}$, 179 - 217 veränderte Sequenz)DM3 ($\Delta A^{154} - T^{177}$, $A^{220} \rightarrow T$)

10 In den vorstehenden Sequenzen werden jeweils die modifizierten Aminosäuren bzw. Aminosäuresequenzen angegeben.

PM1 bedeutet dabei Punktmutation 1 und hat die folgende Sequenz (die ausgetauschten Aminosäure im Vergleich zu Phl p 5b sind fett gedruckt) :

15

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDIDVGFKAAVAAAASVPAALA

1 10 20 30 40 50

FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV

20

51 60 70 80 90 100

ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA

101 110 120 130 140 150

TAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA

25

151 160 170 180 190 200

TVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG

201 210 220 230 240 250

AASGAATVAAGGYKV

30

251 260 265

Die weiteren besonders bevorzugten Peptide haben die folgenden Sequenzen :

35

PM2 ($D^{49} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$) :

- 9 -

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA
1 10 20 30 40 50
5 FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV
51 60 70 80 90 100
ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA
101 110 120 130 140 150
10 TAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA
151 160 170 180 190 200
TVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG
201 210 220 230 240 250
15 AASGAATVAAGGYKV
251 260 265

20 PM3 (A¹³ → C) :

ADAGYAPATPAACGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK
1 10 20 30 40 50
25 FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV
51 60 70 80 90 100
ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA
101 110 120 130 140 150
TAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAA
30 151 160 170 180 190 200
TVAAAPQVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAG
201 210 220 230 240 250
AASGAATVAAGGYKV
35 251 260 265

- 10 -

DM1 ($\Delta K^{50} \rightarrow P^{\Delta 132}$, $D^{49} \rightarrow L$) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA

5 1 10 20 30 40 50

GELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYK

51 60 70 80 90 100

CIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATG

10 103 110 120 130 140 150

AATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

154 160 170 180

15

DM 2 ($\Delta F^{51} - G^{178}$, $D^{49} - L$, $K^{50} - A$) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAALA

20 1 10 20 30 40 50

GAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQK

51 60 70 80 90 100

VSQPATGAATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

25 102 110 120 130 137

DM2* ($\Delta F^{51} - G^{178}$, 179 - 217 veränderte Sequenz) :

30 Diese Sequenz entspricht der Sequenz von DM2, wobei zusätzlich die Aminosäuren der Positionen 179 - 217 des Ausgangspeptids Phl p 5b eine veränderte Sequenz aufweisen und alle nachfolgenden Aminosäuren fehlen.

35

DM3 ($\Delta A^{154} - T^{177}$, $A^{220} \rightarrow T$) :

ADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADK
 1 10 20 30 40 50
 5 FKTFEAAFTSSSKAAAAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFV
 51 60 70 80 90 100
 ASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAA
 101 110 120 130 140 150
 10 TAAGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKTITAMS
 151 160 170 180 190 200
 EVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV
 202 210 220 230 240
 15

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von modifizierten rekombinanten Allergenen durch Verwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion und/oder ihrer Varianten. Bei bekannter Peptidsequenz können die Allergene auch durch an sich bekannte Methoden zur Peptidsynthese, z. B. den modifizierten Merrifield Techniken hergestellt werden, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart;) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher erwähnten Varianten Gebrauch machen. Ferner ist es möglich, die Peptide aus einem ihrer funktionellen Derivate durch Behandeln mit einem solvolysierenden oder hydrogenolysierenden Mittel in Freiheit zu setzen, und/oder eine basisches oder saures Peptid durch Behandeln mit einer Säure oder Base in eines ihrer Salze oder Solvate zu überführen.

Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxy-

gruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen
enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das mit einem
N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe tragen, z. B. solche, die
anstelle einer NH_2 -Gruppe eine NHR' -Gruppe (worin R' eine
5 Aminoschutzgruppe bedeutet, z. B. BOC oder CBZ) enthalten.

Ferner sind Ausgangsstoffe bevorzugt, die anstelle des H-Atoms einer
Hydroxygruppe eine Hydroxyschutzgruppe tragen, z. B. solche, die
anstelle einer Hydroxyphenylgruppe eine $\text{R}''\text{O}$ -phenylgruppe enthalten
10 (worin R'' eine Hydroxyschutzgruppe bedeutet).

Es können auch mehrere - gleiche oder verschiedene - geschützte Amino-
und/oder Hydroxygruppen im Molekül des Ausgangsstoffes vorhanden
sein. Falls die vorhandenen Schutzgruppen voneinander verschieden sind,
15 können sie in vielen Fällen selektiv abgespalten werden.

Der Ausdruck "Aminoschutzgruppe" ist allgemein bekannt und bezieht sich
auf Gruppen, die geeignet sind, eine Aminogruppe vor chemischen Um-
setzungen zu schützen (zu blockieren), die aber leicht entfernbar sind,
20 nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des
Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind ins-
besondere unsubstituierte oder substituierte Acyl-, Aryl-, Aralkoxymethyl-
oder Aralkylgruppen. Da die Aminoschutzgruppen nach der gewünschten
Reaktion (oder Reaktionsfolge) entfernt werden, ist ihre Art und Größe im
25 übrigen nicht kritisch; bevorzugt werden jedoch solche mit 1-20, insbe-
sondere 1-8 C-Atomen. Der Ausdruck "Acylgruppe" ist im Zusammenhang
mit dem vorliegenden Verfahren in weitestem Sinne aufzufassen. Er um-
schließt von aliphatischen, araliphatischen, aromatischen oder hetero-
cyclischen Carbonsäuren oder Sulfonsäuren abgeleitete Acylgruppen
30 sowie insbesondere Alkoxycarbonyl-, Aryloxycarbonyl- und vor allem
Aralkoxycarbonylgruppen. Beispiele für derartige Acylgruppen sind
Alkanoyl wie Acetyl, Propionyl, Butyryl; Aralkanoyl wie Phenylacetyl; Aroyl
wie Benzoyl oder Toluyll; Aryloxyalkanoyl wie POA; Alkoxycarbonyl wie
Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, BOC, 2-
35 Iodethoxycarbonyl; Aralkyloxycarbonyl wie CBZ ("Carbobenzoxyl"), 4-
Methoxybenzyloxycarbonyl, Fmoc; Arylsulfonyl wie Mtr. Bevorzugte

Aminoschutzgruppen sind BOC und Mtr, ferner CBZ, Fmoc, Benzyl und Acetyl.

5 Der Ausdruck "Hydroxyschutzgruppe" ist ebenfalls allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Hydroxygruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen, die aber leicht entfernbar sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind die oben genannten unsubstituierten oder substituierten Aryl-, Alkyl- oder
10 Acylgruppen, ferner auch Alkylgruppen. Die Natur und Größe der Hydroxyschutzgruppen ist nicht kritisch, da sie nach der gewünschten chemischen Reaktion oder Reaktionsfolge wieder entfernt werden; bevorzugt sind Gruppen mit 1-20, insbesondere 1-10 C-Atomen. Beispiele für Hydroxyschutzgruppen sind u.a. Benzyl, p-Nitrobenzoyl, p-Toluolsulfonyl, tert.-
15 Butyl und Acetyl, wobei Benzyl und tert.-Butyl besonders bevorzugt sind. Die COOH-Gruppen in Asparaginsäure und Glutaminsäure werden bevorzugt in Form ihrer tert.-Butylester geschützt (z. B. Asp(OBut)).

20 Das In-Freiheit-Setzen der Verbindungen aus ihren funktionellen Derivaten gelingt - je nach der benutzten Schutzgruppe - z. B. mit starken Säuren, zweckmäßig mit TFA oder Perchlorsäure, aber auch mit anderen starken anorganischen Säuren wie Salzsäure oder Schwefelsäure, starken organischen Carbonsäuren wie Trichloressigsäure oder Sulfonsäuren wie Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure. Die Anwesenheit eines zusätzlichen
25 inerten Lösungsmittels ist möglich, aber nicht immer erforderlich. Als inerte Lösungsmittel eignen sich vorzugsweise organische, beispielsweise Carbonsäuren wie Essigsäure, Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, Amide wie DMF, halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, ferner auch Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol, sowie
30 Wasser. Ferner kommen Gemische der vorgenannten Lösungsmittel in Frage. TFA wird vorzugsweise im Überschuß ohne Zusatz eines weiteren Lösungsmittels verwendet, Perchlorsäure in Form eines Gemisches aus Essigsäure und 70 %iger Perchlorsäure im Verhältnis 9:1. Die Reaktionstemperaturen für die Spaltung liegen zweckmäßig zwischen
35 etwa 0° und 50°, vorzugsweise arbeitet man zwischen 15 und 30° oder Raumtemperatur.

Die Gruppen BOC, OBut und Mtr können z. B. bevorzugt mit TFA in Dichlormethan oder mit etwa 3 bis 5n HCl in Dioxan bei 15-30° abgespalten werden, die FMOC-Gruppe mit einer etwa 5- bis 50 %igen Lösung von
5 Dimethylamin, Diethylamin oder Piperidin in DMF bei 15-30°.

Die Tritylgruppe wird zum Schutz der Aminosäuren Histidin, Asparagin, Glutamin und Cystein eingesetzt. Die Abspaltung erfolgt, je nach
10 gewünschtem Endprodukt, mit TFA / 10% Thiophenol, wobei die Tritylgruppe von allen genannten Aminosäuren abgespalten wird, bei Einsatz von TFA / Anisol oder TFA / Thioanisol wird nur die Tritylgruppe von His, Asn und Gln abgespalten, wogegen sie an der Cys-Seitenkette verbleibt.

15 Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen (z. B. CBZ oder Benzyl) können z. B. durch Behandeln mit Wasserstoff in Gegenwart eines Katalysators (z. B. eines Edelmetallkatalysators wie Palladium, zweckmäßig auf einem Träger wie Kohle) abgespalten werden. Als Lösungsmittel eignen sich dabei die oben angegebenen, insbesondere z. B. Alkohole wie
20 Methanol oder Ethanol oder Amide wie DMF. Die Hydrogenolyse wird in der Regel bei Temperaturen zwischen etwa 0 und 100° und Drucken zwischen etwa 1 und 200 bar, bevorzugt bei 20-30° und 1-10 bar durchgeführt. Eine Hydrogenolyse der CBZ-Gruppe gelingt z. B. gut an 5 bis 10 %igem Pd/C in Methanol oder mit Ammoniumformiat (anstelle von
25 Wasserstoff) an Pd/C in Methanol/DMF bei 20-30°.

Eine Base kann mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden, beispielsweise durch Umsetzung äquivalenter
30 Mengen der Base und der Säure in einem inerten Lösungsmittel wie Ethanol und anschließendes Eindampfen. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Ortho-
35 phosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische

ein- oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Gluconsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalin-mono- und Disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und /oder Aufreinigung der Verbindungen der Formel I verwendet werden.

Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in eines ihrer physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z. B. die Dimethyl-, Monoethyl-, Diethyl- oder Diisopropylammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexylammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z. B. Salze mit Arginin oder Lysin.

Zur Ermittlung der DNA- bzw. Aminosäuresequenzen sind folgende Schritte notwendig:

Die allergenen Bestandteile der nach üblichen Verfahren hergestellten Extrakte werden identifiziert und ihre wesentlichen physikochemischen Parameter charakterisiert. Die Identifizierung als Allergen erfolgt durch Nachweis ihrer Bindungsfähigkeit an IgE-Antikörper von Allergikern. In der Regel benutzt man hierzu an sich bekannte Methoden, wie SDS-PAGE, Isoelektrofokussierung und anschließendes Western Blotting mit Seren von Allergikern, wobei die Entwicklung nur der bindenden Antikörper des IgE-Isotyps vorgenommen wird. Es ist dabei zu beachten, daß ausreichend viele Typen von klinisch gesicherten Allergikern (als Mindestanzahl ist hier ein Wert von 20 anzusetzen) verwendet werden.

Alternativ können auch andere Methoden, wie z.B. die CIE oder CRIE eingesetzt werden.

Diese so identifizierten und charakterisierten Allergene aus Graminaenpollen können analytisch präpariert werden, so daß eine N-terminale Aminosäurebestimmung möglich ist. Weiterhin können die Allergene biochemisch gereinigt und zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Diese monoklonalen Antikörper können, ebenso wie die IgE-Antikörper in den Seren von Allergikern, zur immunologischen Identifizierung und Charakterisierung der Allergene aus natürlichen Quellen oder der Moleküle, die durch die Rekombinantentechnik hergestellt werden, benutzt werden.

Ausgehend von diesen Informationen über Allergene und den Mitteln zur Identifizierung ist es möglich, die Allergene nach bekannten gentechnischen Verfahren zu klonieren und als rekombinante Allergene zu exprimieren. Die DNA-Klone der nach üblichen Verfahren gewonnenen und charakterisierten rekombinanten Allergene sind die Basis für die gentechnische Modifikation die zu den erfindungsgemäßen modifizierten, rekombinant hergestellten Allergenmolekülen führen.

Um die Reaktivität der erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene zu gewährleisten, ist außerdem die Identifizierung der T-Zell-Epitope erforderlich.

Grundlage hierfür ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz der in Frage kommenden Allergene oder die entsprechend zugrundeliegende DNA-Sequenz. Die Aminosäuresequenz wird in der Regel aus der DNA-Sequenz der rekombinanten Allergene deduziert. Im Rahmen dieser Erfindung sind somit zu jeder angegebenen Peptidsequenz auch die zugehörigen DNA-Sequenzen mit eingeschlossen, auch wenn diese nicht explizit offenbart werden, da sie auf bekannte und einfache Weise aus den Peptidsequenzen herleitbar sind.

Basierend auf der Aminosäuresequenz wird eine Serie von überlappenden Oligopeptiden nach üblichen Verfahren, wie z.B. Festphasensynthese

nach modifizierten Merrifield-Techniken, hergestellt, wobei die gesamte Sequenz der Allergene abgedeckt wird. Geeignet sind hierbei Oligopeptide mit jeweils 6 - 20, vorzugsweise 9 -15 Aminosäureresten. Ganz besonders geeignet sind Dodecapeptide mit einem Versatz um jeweils 3 Aminosäuren, die überlappend die gesamte Sequenz des jeweiligen Allergens abdecken.

Zur Identifizierung der T-Zell-Epitope werden von Graminaenpollen-Allergikern T-Zell-Klone durch wiederholte Stimulierung mit dem gereinigten natürlichen oder rekombinant hergestellten in Frage kommenden Allergen nach dem üblichen Verfahren etabliert (Lit.). Hierzu muß eine repräsentative Anzahl von T-Zell-Klonen, die von ausreichend vielen Spendern abstammen, etabliert werden.

Diese T-Zell-Klone werden mit den oben beschriebenen überlappenden Peptiden inkubiert und deren Fähigkeit, die T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren, getestet. Die Proliferation wird durch Einbau von [³H]-Thymidin mit an sich üblichen Verfahren bestimmt. Diejenigen Oligopeptide, die eine ausreichende Proliferation der T-Zell-Klone auslösen, werden als Peptidliganden, die den T-Zell-Epitopen entsprechen, angesehen. Die so bestimmten T-Zell-Epitope dienen zur Festlegung von T-Zell-reaktiven Bereichen der Allergene, die ihrerseits die Basis für die Konstruktion der erfindungsgemäßen modifizierten rekombinanten Allergene darstellen.

Um die Reaktivität von modifizierten rekombinanten Allergenen mit den T-Lymphozyten, die bei Allergikern auftreten, zu gewährleisten, werden die T-Zell-reaktiven Bereiche, die die immundominanten T-Zell-Epitope einschließen, von Veränderungen hinsichtlich der Primärstruktur teilweise oder vollständig ausgeschlossen.

In den verbleibenden Bereichen der Polypeptide (Allergene) werden in den zugrundeliegenden DNA-Sequenzen gentechnisch Mutationen vorgenommen, um eine veränderte Primärstruktur zu erzeugen. Durch diese veränderte Primärstruktur wird die Bindungsfähigkeit von sequenzabhängigen kontinuierlichen B-Zell-Epitopen zu den IgE-Antikörpern zerstört oder eingeschränkt und die Reaktivität von konformationsabhängigen, eventuell diskontinuierlichen Epitopen mit ihren Antikörpern durch die Ausbildung einer abgewandelten Tertiärstruktur als Folge der Primärmodifikation vollständig oder teilweise aufgehoben.

Die Mutationen können Substitutionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren außerhalb der T-Zell-reaktiven Bereich darstellen. Solche Punktmutationen werden durch ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in die DNA, die z. B. für das rPhl p 5b kodiert, eingeführt. Als Matrize können dabei das Plasmid pGS13, ein Expressionsvektor (pMalc), der die cDNA für rPhl p 5b enthält, dienen. Zur PCR werden genspezifische Primer verwendet, die entsprechende Basenaustausche und gleichzeitig eine neue Restriktionsschnittstelle (Nhe I bzw. Sph I) enthalten. Die in der PCR amplifizierten Fragmente, die die Mutation tragen, wurden nacheinander in einen Klonierungsvektor ligiert, und dann das komplette Produkt in den pMalc-Expressionsvektor umkloniert.

Weiterhin können Mutationen durch unterschiedlich angeordnete Deletionen vorgenommen werden. Zur Herstellung der Deletionsmutanten werden in einer PCR mit Hilfe von genspezifischen Primern verkürzte 3'-terminale Fragmente der cDNA von rPHI p 5b hergestellt. Aus den Ausgangsvektoren (pGS12 oder pGS13) werden durch Restriktion an internen Schnittstellen größere 3'-terminale Fragmente entfernt, und an deren Stelle die jeweils kleineren in der PCR amplifizierten Fragmente einligiert.

In analoger Art und Weise lassen sich Mutationen durch Additionen von ein oder mehreren Aminosäuren durch Einschub von zusätzlich DNA-Fragmenten erzeugen.

Die gentechnisch mutierten DNA-Klone, die für modifizierte rekombinante Allergene kodieren, werden in geeignete Expressionsvektoren umklont und in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht. Aus den Überständen oder Aufschlüssen dieser Wirtsorganismen werden in üblicher Weise die Fusionsproteine gereinigt und nach Abspaltung des Fusionsanteils die modifizierten rekombinanten Allergene mit üblichen biochemischen Methoden rein dargestellt. Es ist wichtig, dass die modifizierten rekombinanten Allergene als reine Komponenten, die den natürlichen Allergenen entsprechen, für weitere Testmengen benutzt werden.

Die Auswirkungen der induzierten Mutationen auf die Allergenität, d.h. der Bindungsfähigkeit an IgE-Antikörper von Allergikern, der modifizierte rekombinante Allergene wird durch den EAST-Hemmtest qualitativ und quantitativ bestimmt. Dieser Assay zeigt, ob eine zu testende Substanz (modifiziertes rekombinantes Allergen) mit dem natürlichen Allergen und/oder dem rekombinanten Wildtyp identisch oder verschieden ist. Darüber hinaus läßt sich der Grad der immunchemischen Verwandtschaft (Kreuzreaktivität) quantifizieren. Dieser EAST-Hemmtest berücksichtigt nur die Reaktion mit IgE-Antikörpern.

Als geeignete modifizierte rekombinante Allergene-Varianten werden diejenigen ausgewählt, die eine im Vergleich zum natürlichen Allergen und/oder rekombinanten Wildtyp mindestens um den Faktor 10^2 verringerte Hemmwirkung, gemessen als P_{rel} bei 50% Hemmung, aufweisen.

Die so ausgewählten modifizierte rekombinante Allergene-Varianten werden überprüft, ob die T-Zell-Reaktivität tatsächlich erhalten ist. Dazu wird in der ersten Phase ein Satz von T-Zellklonen, die mit Epitopen in den T-Zell-reaktiven Bereichen reagieren, zur Testung herangezogen.

Nur solche modifizierte rekombinante Allergene werden berücksichtigt, die die ausgewählten Klone zur Proliferation stimulieren.

In der zweiten Phase werden oligoklonale T-Zell-Linien, die durch mehrfache Stimulierung mit den betreffenden Allergen etabliert worden sind, zur Testung eingesetzt. Wiederum werden nur solche modifizierten rekombinanten Allergene berücksichtigt, die mindestens einen Stimulationsindex (SI) von 50 % des SI des Wildtyps bedingen.

In der dritten Phase werden polyklonale Kurzzeit-T-Zell-Kulturen aus dem peripheren Blut von Allergikern zur Testung eingesetzt.

Für die allergische Reaktion (Nebenwirkung) ist außer der Bindung des Allergens an das spez. IgE die allergeninduzierte, IgE-vermittelte Histaminfreisetzung durch allergische Effektorzellen von pathophysiologischer Bedeutung. Dabei ist auch die Reagibilität der Effektorzellen (Basophile, Mastzellen) und die Epitopspezifität der über FcεRI gebundenen IgE-Antikörper von Belang. Deshalb werden die modifizierte rekombinante Allergene-Varianten auf ihre Potenz zur Induktion der Histaminfreisetzung durch Degranulation IgE-beladener Basophiler, die aus dem Blut von Allergikern präpariert werden, getestet. Die modifizierte rekombinante Allergene-Varianten, die nach obigen Selektionsregime ausgewählt worden sind, müssen in diesem funktionellen Test eine starke reduzierte Fähigkeit zur Histaminfreisetzung aufweisen.

Die modifizierte rekombinante Allergene, die diese Anforderungen erfüllen, gewährleisten eine Reaktivität mit der Mehrheit der regulatorisch wirksamen TH-Zellen und besitzen aufgrund ihrer verminderten IgE-Reaktivität die erforderlichen Eigenschaften, um als Therapeutika zur allergenspezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) von Graminaenpollenallergikern eingesetzt zu werden.

Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Zubereitungen enthaltend ein oder mehrere modifizierte rekombinante Allergene gemäß der vorliegenden Erfindung und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate sowie gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von IgE-vermittelten Allergien.

5 Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, wobei mindestens ein modifiziertes rekombinantes Allergen und/oder eines seiner physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.

10 Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene und/oder ihrer physiologisch unbedenklichen Salze oder Solvate zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, insbesondere auf nicht-chemischem Wege. Hierbei können sie zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder
15 mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden. Die Arzneimittel dienen zur immunspezifischen Therapie, d. h. zur Hyposensibilisierung bei Allergien. Die direkte Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene zur immunspezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien ist ebenfalls denkbar.

20 Diese Zubereitungen können als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale), parenterale, topische Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalation-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht
25 reagieren, beispielsweise Wasser, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Pulver, Granulate, Sirupe, Säfte oder Tropfen, zur rektalen
30 Anwendung Suppositorien, zur parenteralen Anwendung Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, für die topische Anwendung Salben, Cremes oder Puder. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten
35 verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert

- sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farb-, Geschmacks- und /oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z. B. ein oder mehrere Vitamine.
- 5 Für die Applikation als Inhalationsspray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder Treibgasgemisch (z. B. CO₂ oder Fluorchlorkohlenwasserstoffen) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch
- 10 verträgliche Lösungsmittel zugegen sein können, z. B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabreicht werden.
- Die Verbindungen und ihre physiologisch unbedenklichen Salze können
- 15 zur Hyposensibilisierung von Allergikern bei der Bekämpfung von allergischen Erkrankungen, insbesondere von Allergien, die durch Gräser und Graspollen hervorgerufen werden, verwendet werden.
- Dabei können die erfindungsgemäßen Substanzen in der Regel in Analogie zu anderen bekannten, im Handel befindlichen Peptiden, insbesondere aber in Analogie zu den in der US-A-4 472 305 beschriebenen Verbindungen verabreicht werden, vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,05 und 500 mg, insbesondere zwischen 0,5 und 100 mg pro
- 20 Dosierungseinheit verabreicht. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,01 und 2 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für
- 25 jeden Patienten hängt jedoch von den verschiedensten Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der eingesetzten speziellen Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabreichungszeitpunkt und -weg, von
- 30 der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und Schwere der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die parenterale Applikation ist bevorzugt.
- 35 Vor- und nachstehend sind alle Temperaturen in °C angegeben. Zur Isolierung der Produkte gibt man, falls erforderlich, Wasser hinzu, stellt,

falls erforderlich, je nach Konstitution des Endprodukts auf pH-Werte zwischen 2 und 10 ein, extrahiert mit Ethylacetat oder Dichlormethan, trennt ab, trocknet die organische Phase über Natriumsulfat, dampft ein und reinigt durch Chromatographie an Kieselgel und /oder durch
5 Kristallisation.

Beispiel 1

10 **Identifizierung der T-Zell-Epitope zur Bestimmung der T-Zell-reaktiven Bereiche des Graspollenhauptallergens Phl p5**

Für die Etablierung von T-Zell-Linien (TCL) und -Klonen (TCC), die mit dem Graspollenhauptallergen der Gruppe 5 des Lieschgrases (Phleum pratense) Phl p5 reagieren, wurden Patienten ausgewählt, die anamnestisch eine typische Symptomatik für eine Gräserpollenallergie (Rhinitis)
15 angaben und einen positiven Hauttest (Pricktest) aufwiesen. Diese Patienten hatten zirkulierende spezifische IgE-Antikörper mit einer RAST-Klasse ≥ 3 .

20 Es wurden je Patient 40 ml heparinisiertes Blut gewonnen. Danach wurden aus dieser Blutprobe nach üblichem Verfahren mittels Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Analoge Zellisolierungen erfolgten später, wenn die Gewinnung bestrahlter autologer Antigen-präsentierender Zellen (APZ) zur weiteren
25 Charakterisierung der TCL und TCC notwendig war. Nach Zählung der PBMC wurden TCL mit Reaktivität auf Gruppe 5-Allergene in vitro wie folgt und bereits an anderen Stellen detailliert beschrieben (Lit. 1) etabliert: In 24 well - Mikrokulturplatten wurden pro Kavität 1,5 bis $2,0 \times 10^6$ PBMC in 1 ml Kulturmedium (UltraCulture) 7 Tage lang unter Zugabe von
30 immunaffinitätschromatographisch gereinigten natürlichen Phl p5-Allergenen (je 10 $\mu\text{g}/\text{well}$) stimuliert. Es wurden insgesamt 8 bis 10 dieser Kulturen angelegt. Die immunoaffinitätschromatographische Isolierung von Phl p 5 ist detailliert beschrieben (Lit. 2). Nach Ablauf der 7 Tage-Kultivierung wurde den Zellkulturen IL-2 (10 bis 20 IU/well) für weitere 5
35 bis 7 Tage zugegeben. Anschließend wurden alle Einzelkulturen gepoolt, über Dichtegradientenzentrifugation die T-Zellblasten angereichert und die

gewonnene TCL im spezifischen Lymphozytenproliferationstest geprüft (siehe auch Lit. 1). Hierzu wurden in 96 well - Mikrokulturplatten im Dreifachansatz jeweils 2×10^4 /ml TCL-Blasten mit 5×10^4 /ml bestrahlten autologen APZ's kultiviert. Als spezifischer Antigenstimulus wurden 10 - 20 μ g Phl p5-Allergen hinzugegeben. Nach 56 Stunden Inkubation wurde zu den Mikrokulturen 3 H-markiertes Thymidin (1μ Ci/well) pipettiert. Weitere 16 Stunden später wurde die in den proliferierenden T-Zellblasten inkorporierte Radioaktivität in einem Beta-Counter (Matrix 96) gemessen. Die Resultate wurden als arithmetisches Mittel der Mehrfachansätze in Counts pro Minute (cpm) errechnet. Das Kriterium für die Qualität der TCL war der Stimulationsindex, der sich aus der Relation der cpm-Werte mit Phl p5-Zusatz zu denen ohne Phl p5-Zusatz ergab.

Nach Auswahl der TCL's wurden diese kloniert (s. Lit. 1). Dazu wurden 0,3 TCL-Blasten / well in einem Endvolumen von 0,2 ml in 96 well-Mikrokulturplatten (Rundboden) unter Zugabe bestrahlter allogener PBMC (5×10^4 /well), PHA (1,5 g/ml) und IL-2 (25 IU/ml) kultiviert. Nach 12 bis 14 Tagen wurden die Kulturen mit frischen bestrahlten PBMC, PHA und IL-2 gefüttert. Außerdem wurde alle 4 bis 5 Tage ein Mediumaustausch unter Zugabe von IL-2 (25 IU/ml) durchgeführt. Vor Durchführung des Phl p5 - spezifischen Proliferationstestes verstrich eine ca. 10 Tage lange Periode ohne Zugabe bestrahlter allogener PBMC. Die ausgewählten TCC wurden dann in 24 well - Mikrokulturplatten durch wiederholte Stimulation mit PHA, bestrahlten allogenen PBMC und IL-2 (50 IU/ml) vermehrt.

Nach Klonierung einer TCL (siehe unten) wurde die Spezifität der isolierten TCC wie eben beschrieben bestimmt. Für die TCC wurden Stimulationsindices von mindestens 5 als positiv gewertet. Auch die Bestimmung von T-Zellepitopen zur Festlegung der T-Zell-reaktiven Bereiche auf Gruppe 5 - Allergenen erfolgte mittels spezifischer Proliferationsteste, wobei hierfür jeweils 1-2 μ g/ml synthetisierter Dodecapeptide eingesetzt wurden (siehe unten).

Für die Bestimmung der T-Zellepitope wurden insgesamt 86 überlappende synthetische Dodecapeptide verwendet, die auf der Grundlage der bekannten Primärstruktur des Phl p 5b-Allergens gemäß Bufer et al. (Lit. 3)

hergestellt wurden. Die Herstellung dieser Peptide erfolgte mit einem kommerziellen Synthese-Kit der Firma CHIRON Mimotopes Peptide Systems / Clayton, Australien. Diese Peptide besaßen bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen einen Überlappingsgrad von 9 Aminosäuren (Tab. 1). Die Reaktion von TCC auf eines der im spezifischen Proliferationstest verwendeten Peptide wurde als positiv bewertet, wenn der errechnete Stimulationsindex mindetens 5 betrug.

In die Untersuchungen wurden TCC von 18 Graspollenallergikern einbezogen. Von diesen konnten 54 T-Zellklone isoliert werden, die mit den Dodecapeptiden, basierend auf der Phl p 5b-Sequenz, spezifisch reagieren. Die Analyse dieser TCC zeigt eine deutliche Konzentration der Erkennung von Peptidliganden in 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen. Von den 54 T-Zellklone reagieren 46, dies entspricht 85%, mit den Peptiden der 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen A, B und C des Phl p 5b (Tab. 1a). Nur 8 T-Zellklone reagierten mit 5 anderen Peptidliganden, wobei 3 Peptide von jeweils 2 differenten Klonen erkannt werden. Der immundominante T-Zell-reaktive Bereich A umfaßt ein Peptid (27mer) entsprechend den Positionen 181-207, mit einer Kernregion bestehend aus den Aminosäuren 181-195. 28 der 54 Phl p 5b-reaktiven TCC, dies entspricht 51%, reagieren allein mit diesem immundominanten Bereich A.

Mit den T-Zell-reaktiven Bereichen C (Position 16-48; 33mer) und B (Position 133-150) reagieren 9 (17%) bzw. 9 (17%) der T-Zell-Klone. Diese Konzentration der TH-Zellen des untersuchten Allergikerkollektivs auf die Erkennung von 3 immundominanten T-Zell-reaktiven Bereichen des Hauptallergens Phl p 5b läßt die Konstruktion von Phl p 5b-Mutanten zu, bei denen diese Bereiche von den Punkt-, Deletions- oder Additions-Mutationen nicht berührt werden. Damit ist die Voraussetzung gegeben, daß solche Allergen-Mutanten mit der bei Allergikern vorhandenen Allergen-reaktiven TH-Zellen spezifisch reagieren und diese im therapeutischen Sinne beeinflussen.

Tab. 1: Auf der Phl p 5b-Sequenz basierende Dodecapeptide zur Bestimmung der T-Zell-reaktiven Bereiche

5	1	ADAGYAPATPAA	44	KIPAGELQIIDK
	2	GYAPATPAAAGA	45	AGELQIIDKIDA
	3	PATPAAAGAAAG	46	LQIIDKIDAAFK
	4	PAAAGAAAGKAT	47	IDKIDAAFKVAA
	5	AGAAAGKATTEE	48	IDAAFKVAATAA
	6	AAGKATTEEQKL	49	AFKVAATAAATA
10	7	KATTEEQKLIED	50	VAATAAATAPAD
	8	TEEQKLIEDINV	51	TAAATAPADDKF
	9	QKLIEDINVGFK	52	ATAPADDKFTVF
	10	IEDINVGFKA AV	53	PADDKFTVFEEA
	11	INVGFKA AVAAA	54	DKFTVFEEAFNK
	12	GFKAAVAAAASV	55	TVFEEAFNKA IK
	13	AAVAAAASVPAA	56	EAAFNKAIKEST
15	14	AAAASVPAADKF	57	FNKAIKESTGGA
	15	ASVPAADKFKTF	58	AIKESTGGAYDT
	16	PAADKFKTFEAA	59	ESTGGAYDTYKC
	17	DKFKTFEAAFTS	60	GGAYDTYKCIPS
	18	KTFEAAFTSSSK	61	YDTYKCIPSLEA
	19	EAAFTSSSKAAA	62	YKCIPSLEAAVK
	20	FTSSSKAAA AKA	63	IPSLEAAVKQAY
20	21	SSKAAA AKA PGL	64	LEAAVKQAYAAT
	22	AAA AKA PGLVPK	65	AVKQAYAATYAA
	23	AKAPGLVPKLDA	66	QAYAATVAAA PQ
	24	PGLVPKLDAAYS	67	AATVAAA PQVKY
	25	VPKLDAAYS VAY	68	VAAAPQVKYAVF
	26	LDAAYS VAYKAA	69	APQVKYAVFEAA
	27	AYSVAYKAAVGA	70	VKYAVFEAA LTK
25	28	VAYKAAVGATPE	71	AVFEAA LTKAIT
	29	KA AVGATPEAKF	72	EAALTKAITAMS
	30	VGATPEAKFDSF	73	LTKAITAMSEVQ
	31	TPEAKFDSFVAS	74	AITAMSEVQKVS
	32	AKFDSFVASLTE	75	AMSEVQKVSQPA
	33	DSFVASLTEALR	76	EVQKVSQPATGA
30	34	VASLTEALRVIA	77	KVSQPATGAATV
	35	LTEALRVIA GAL	78	QPATGAATVAAG
	36	ALRVIA GALEVH	79	TGAATVAAGAAT
	37	VIAGALEVHAVK	80	ATVAAGAATTAA
	38	GALEVHAVK PVT	81	AAGAATTAAAGAA
	39	EVHAVK PVT EEP	82	AATTAAGAASGA
	40	AVK PVT EEPGMA	83	TAAGAASGAATV
35	41	PVT EEPGMAKIP	84	GAASGAATVAAG
	42	EEP GMAKIPAGE	85	SGAATVAAGGYK
	43	GMAKIPAGELQI	86	GAATVAAGGYKV

Tab. 1a: Kartierung der T-Zell-reaktiven Bereiche des Graspollen-hauptallergens Phl p 5

5	TCC	Stimulierende Peptidliganden (12mer)	Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich			Minor Epitop
			A	B	C	
10	DW 8	139-150		+		
	DW 14	196-207	+			
	DW 16	181-192, 184-195	+			
	DW 23	181-192	+			
	DW 25	181-192, 184-195	+			
	DW 28	184-195	+			
15	CBH 1	211-222, 214-225				+
	CBH 10	211-222				+
	JR 6a	22-33, 25-36			+	
	JR 6b	136-147, 139-150		+		
	JR 7a	28-39, 31-42			+	
	JR 7b	136-147, 139-150		+		
20	JR 9	181-192, 184-195	+			
	JR 10	19-30			+	
	JR 11	49-60				+
	JR 13	181-192, 184-195	+			
	JR 15	181-192, 184-195	+			
	JR 19a	31-42			+	
25	JR 19b	136-147		+		
	JR 24	97-108, 100-111				+
	JR 25	181-192, 184-195	+			
	JR 27	184-195	+			
	KS 1	181-192, 194-195	+			
	KS 2	181-192, 194-195	+			
30	KS 3	181-192, 194-195	+			
	KS 4	181-192, 194-195	+			
	KS 5	181-192, 194-195	+			
	KSE 18	43-54				+
	UD 6	112-123				+
	GE 4	136-147, 139-150		+		
35	GE 7	136-147		+		
	GE 12	37-48			+	
	AS 4	181-192, 184-195	+			
	AS 5	181-192, 184-195	+			
	UZH 2	136-147, 139-15		+		
	UZ 25	97-108				+

- 28 -

5	CB 1	190-201, 193-204	+			
	CB 2	181-192, 184-195	+			
	CB 7	25-36			+	
	CB 10	181-192, 184-195	+			
	CB 14	181-192	+			
	MF 11	184-195	+			
	AH 19	16-27			+	
	AH 26	139-150		+		
	JMD 3	133-144		+		
10	45		A22	9B	7c	7
	II 3.2A 12	31-42			+	
	II 12.7F11	196-207	+			
	II 12.5C10	187-198	+			
	II 17.9E5	184-195	+			
	II 17.1D8	184-195	+			
	II 17.11C2	184-195	+			
	II 17.19A1	193-204	+			
	II 17.12F5	25-36			+	
15	II 17.3C10	49-60, 52-63				+
	54		28	9	9	8

20

25

30

35

Literatur:

1. Müller WD, Karamfilov T, Fahlbusch B, Vogelsang H, Jäger L:
„Analysis of human T cell clones reactive with group V grass pollen
allergens“. Int. Arch. Allergy Immunol. 1994, 105:391-396.
- 5 2. Jung K, Fahlbusch B, Müller WD, Hermann D, Diener C, Jäger L:
„Isolation of timothy (Phleum pratense) allergens using affinity
chromatography with monoclonal antibodies“. Allergy Immunol (Leipzig)
1989, 35:287-294
- 10 3. Bufe A, Schramm G, Keown MB, Schlaak M, Becker WM:
„Major allergen Phl p 5b in timothy grass is a novel pollen RNase“. FEBS
Letters 1995, 263:6-12.

15 Beispiel 2

**Herstellung der Punktmutanten PM1, PM2 ($D^{48} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$) und PM3
($A^{13} \rightarrow C$) des rPhl p 5b**

20

PM2:

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pGS13. Es handelt sich hierbei
um einen pMalc-Vektor (Biolabs), der die cDNA für das wt rPhl p 5b Bam HI
/ Hind III kloniert enthält. In einer PCR-Reaktion wurden die Fragmente 1
25 (Bp: 1 - 153) und 2 (Bp: 141 - 1374) der cDNA des rPhl p 5b amplifiziert.
Dazu wurden folgende Primer verwendet (Restriktionsschnittstellen sind
unterstrichen):

Fragment 1:

30

Phl p 5b sense:

5'-ATATGGATCCATCGAGGGAAGGGCCGATGCCGGCTACGCC-3'

MP1 antisense:

5'-GAACGCTAGCCGCCGCAGGGACGCTGGC-3'

35

Fragment 2:

MP1 sense:

5'-GCGCTAGCGTTCAAGACCTTCGAG-3'

5

Phl p 5b antisense:

5'-ATATAAGCTTTCCTCTGAAGGAAGGCAACCC-3'

- 10 Die beiden Mutagenese-Primer MP1 sense und MP1 antisense enthalten 6 Basenaustausche gegenüber der wt-Sequenz, die zusätzlich eine neue Restriktionsschnittstelle für das Enzym Nhe I, ergeben.

- 15 Das amplifizierte Fragment 1 wurde Bam HI /Nhe I verdaut und in den Vektor pUH89 (Jekel et al., Gene: 154, 55-59; 1995) kloniert. Das resultierende Plasmid pGS10 wurde erneut mit Nhe I / Hind III restringiert und in diese Schnittstellen das Fragment 2 (Nhe I / Hind III) eingebaut. Dieses Plasmid pGS11 enthält die komplette cDNA, die für das rPhl p 5b kodiert, mit den gewünschten Basenaustauschen. Zur Expression der
- 20 Punktmutante rPhl p 5b PM2 wurde die mutierte cDNA in die Bam HI / Hind III-Schnittstellen in den Expressionsvektor pMalc umklont. Das entstandene Plasmid wurde mit pGS21 bezeichnet.

- 25 Die Punktmutante rPhl p 5b PM1 wurde analog zu PM2 hergestellt. Sie enthält, bedingt durch einen PCR-Fehler, eine zusätzliche Punktmutation: N³² → D.

Zur Klonierung dieser Punktmutante wurde die gesamte cDNA von rPhl p 5b im Vektor p GS13 in einer PCR mit folgenden Primern appliziert.

- 30 PCysM1:
5'ATATGGATCCATCGAGGGTAGGGCCGATGCCGGCTACGCCCCGGC
CACCCCGGCTGCATGCGGAGCG-3'

Phl p 5b antisense: siehe oben.

35

- 31 -

Der Mutagenese-Primer PCysM1 enthält 3 Basenaustausche gegenüber der wt-Sequenz, die zum Austausch eines Alanin-Restes gegen einen Cystein-Rest führen, und gleichzeitig eine neue Restriktionsschnittstelle für das Enzym Sph I ergeben. Das PCR-Produkt wurde direkt in den Expressionsvektor pMalc (Bam HI / Hind III) kloniert. Der resultierende Vektor wurde mit pCysM1 bezeichnet. Die erfolgreiche Mutagenese wurde in einer Restriktionsanalyse mit Sph I überprüft.

10 Beispiel 3

Herstellung der Deletionsmutanten DM1 ($\Delta K^{50} - P^{132}$, $D^{49} \rightarrow L$), DM2 ($\Delta F^{51} - G^{178}$, $D^{49} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$) und DM3 ($\Delta A^{154} - T^{177}$, $A^{220} \rightarrow T$)

15 Als Ausgangsvektor für die Klonierung der Deletionsmutante DM1 diene das Plasmid pGS21 (siehe oben). In einer PCR wurde das Fragment Bp 399 - 1374 der cDNA von rPhl p 5b amplifiziert unter Verwendung der folgenden Primer:

20

MP2 sense:

5'-GCTAGCCGCGAGCTGCAGATCATCG-3'

25

Phl p 5b antisense: siehe oben.

Der Vektor pGS21 wurde Nhe I / Bam HI restringiert, vom herausgeschnittenen Fragment getrennt und in den Restvektor das ebenfalls Nhe I / Bam HI restringierte PCR-Produkt einligiert. Der daraus resultierende Vektor pDM1 enthält die cDNA des rPhl p 5b mit einer Deletion von 252 bp, die für die Deletionsmutante rPhl p 5bDM1 kodiert. Die Deletionsmutanten DM2 und DM3 wurden analog hergestellt.

35

Beispiel 4**Nachweis der verminderten Allergenität (IgE-Reaktivität) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten durch den EAST-Hemmtest**

5

Die Bindung der Allergene durch die IgE-Antikörper ist die Grundvoraussetzung für die Allergen-spezifische Aktivierung der Effektorzellen (Mastzellen, Basophile u.a.) bei der Typ I-Allergie. Die Bindung der Allergene an IgE-Antikörper kann am besten mit der Allergen-spezifischen Hemmung des Enzym-Allergen-Sorbent-Tests (EAST) qualitativ und quantitativ erfaßt werden. Der EAST-Hemmtest wird wie folgt ausgeführt. Mikrotiterplatten werden mit Allergen (natürliches oder rekombinantes Phl p 5 bzw. Phl p 5b) beschichtet (1 µg/ml). Nach Entfernung der nicht gebundenen Allergenmoleküle durch Waschung werden unspezifische Plastbindungsstellen mit Rinderserumalbumin (0,5%) blockiert. Anti-IgE von Allergikern, als repräsentativer Pool von 10-30 Spendern oder als Einzelserum, wird in einer geeigneten Verdünnung mit den Allergen-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Die gebundenen allergenspezifischen IgE-Antikörper werden mittels Enzym-gekoppeltem Anti-IgE (z.B. Alk. Phosphatase - α-IgE) quantifiziert. Diese Bindung wird durch lösliches Allergen oder die zu prüfende Substanz (Allergen-Mutanten) in Abhängigkeit von der Konzentration gehemmt. Als Bezug dient die Hemmkurve mit dem gereinigten natürlichen Allergen Phl p 5b.

25

Mit dem repräsentativen Allergikerserum-Pool Bor 18/100 (20 Spender) ergeben sich die in Abb. 1 dargestellten Hemmkurven.

Das rPhl p 5b (Wildtyp) und die PM3 zeigen dem affinitätschromatographisch gereinigten, natürlichen Phl p 5b ähnliche Bindungskurven. Geringfügige Unterschiede werden durch bessere Hemmwirkung im niedrigeren Bereich sowie durch schlechtere Hemmung in hohen Konzentrationen sichtbar. Die Ursache hierfür ist unbekannt, könnte aber in geringfügig differierenden Konformationsepitopen begründet sein.

35

Die Punktmutante PM1 zeigt diesen Effekt im höheren Bereich etwas stärker ausgeprägt. Deutlich verminderte Hemmwirkung weisen die Deletionsmutanten DM1 und DM3 auf. Dies belegt die stark reduzierte Allergenität dieser Allergen-Mutanten, die damit mit chemisch modifizierten Allergen (Allergoiden) vergleichbar sind.

Die Deletionsmutanten DM2 und DM2* zeigen eine extrem geringe Hemmwirkung der Allergen-IgE-Reaktion. Dies zeigt, daß die Allergenität dieser Mutanten weitgehend elimiert ist. Ein anderer Allergiker-Serumpool (We 6/97) sowie die Einzelseren der Allergiker II3, II12 und II17 zeigen zwar leichte Variationen der Hemmkurven mit den Mutanten, bestätigen aber, daß die Deletionsmutanten DM1 und DM3 eine stark reduzierte Allergenität aufweisen (Abb. 2-5). Die Hemmwirkung der Deletionsmutanten DM2 und DM2* ist auf eine geringe Restaktivität eliminiert. Die Punktmutationen PM1 und PM3 zeigen keine oder nur eine meist geringe Reduktion der Allergenität (z.B. PM1 mit Pool We 6/97 und Einzelserum II 17). Die Hemmkapazität der modifizierten Allergene kann durch Berechnung der Prel-Werte bei 25%iger oder 50%iger Hemmung quantifiziert werden (1). Die entsprechenden Hemmwerte und sowie die Allergene Potenz (Prel) gemessen bei 25 bzw. 50% Hemmung sind in den Tabellen 2-6 für die Serumpools und Einzelseren dargestellt.

Die Deletionsmutation DM2 und DM2* zeigen den Verlust der Allergenität durch die extrem kleinen oder nicht mehr sinnvoll bestimmbar Prel-Werte. Die Punktmutationen PM1 und PM3 zeigen teilweise einen Allergenitätsverlust, der aber für praktische Anwendung nicht ausreicht. Die Deletionsmutanten DM 1 und DM 3 weisen eine starke Reduzierung der Allergenität auf. Die Reduzierung der IgE-Reaktivität ist besser oder vergleichbar mit den bisher bekannten chemisch modifizierten Allergenen und macht dadurch diese Mutanten zu besonders geeigneten Kandidaten für die Immuntherapie.

Literatur

- Anderson MC and Baer H: Methology for RAST inhibition. Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland, U.S.A. (1986).

- 34 -

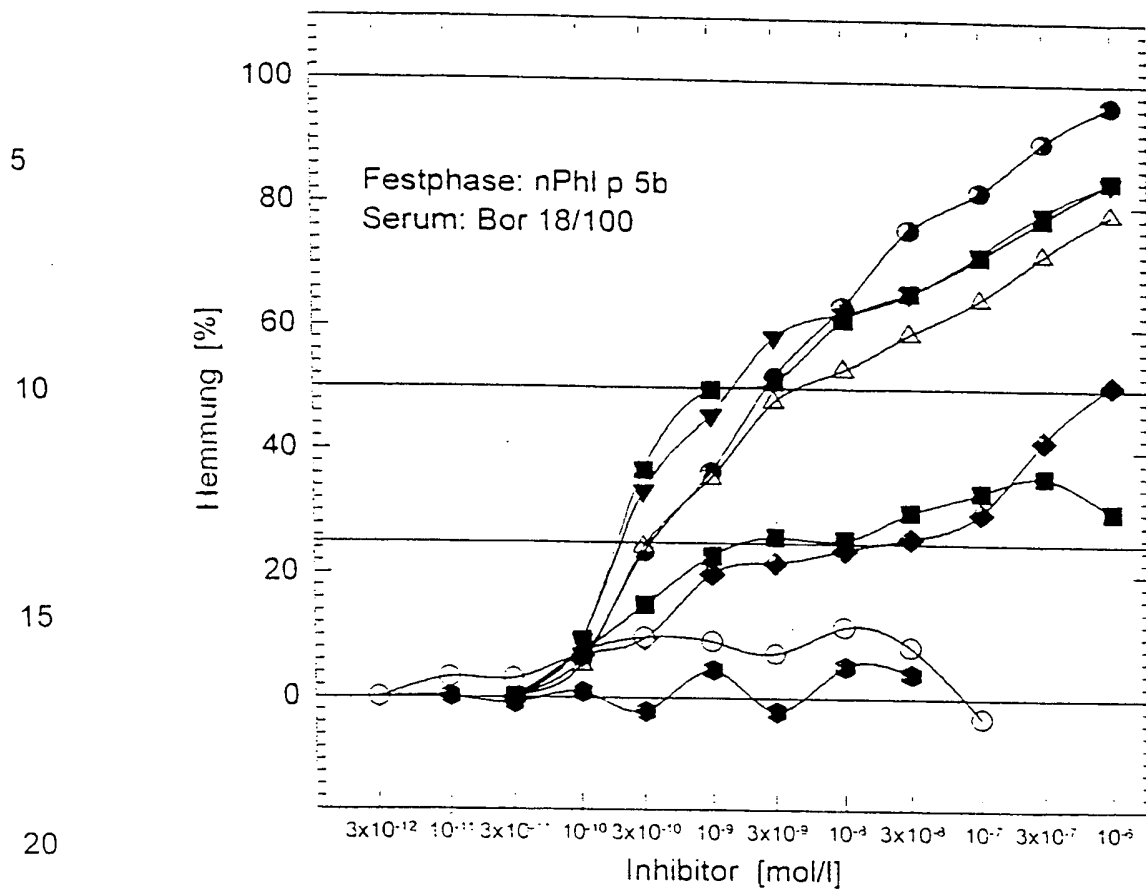


Abbildung 1 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Serumpool Bor 18/100

Inhibitoren:

●—● nPhl p 5b

△—△ PM 1

◆—◆ DM 1

●—● DM 2

■—■ rPhl p 5b

▼—▼ PM 3

■—■ DM 3

○—○ DM 2*

- 35 -

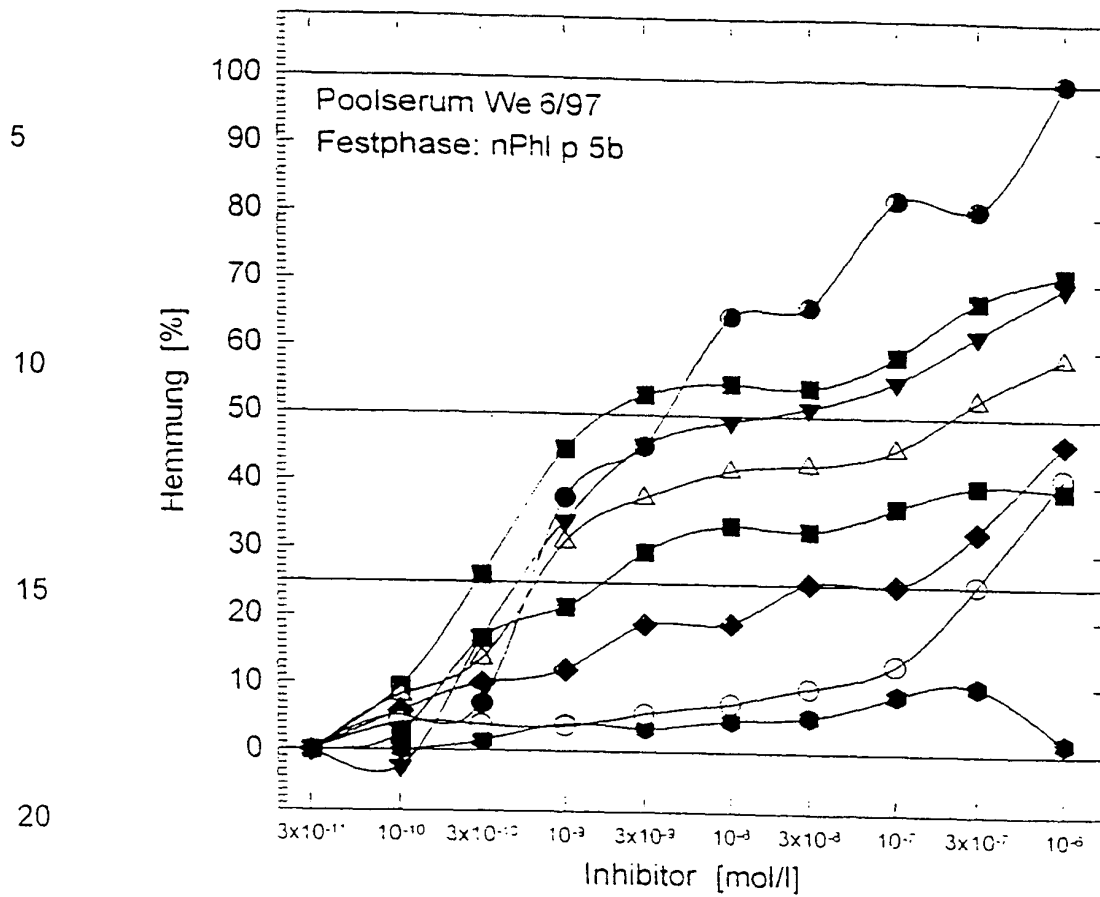


Abbildung 2 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Serumpool We 6/97

Inhibitoren:

- | | | | |
|---------------|----------|----------|-----------|
| ●—● nPhl p 5b | △—△ PM 1 | ◆—◆ DM 1 | ●—● DM 2 |
| ■—■ rPhl p 5b | ▼—▼ PM 3 | ■—■ DM 3 | ○—○ DM 2* |

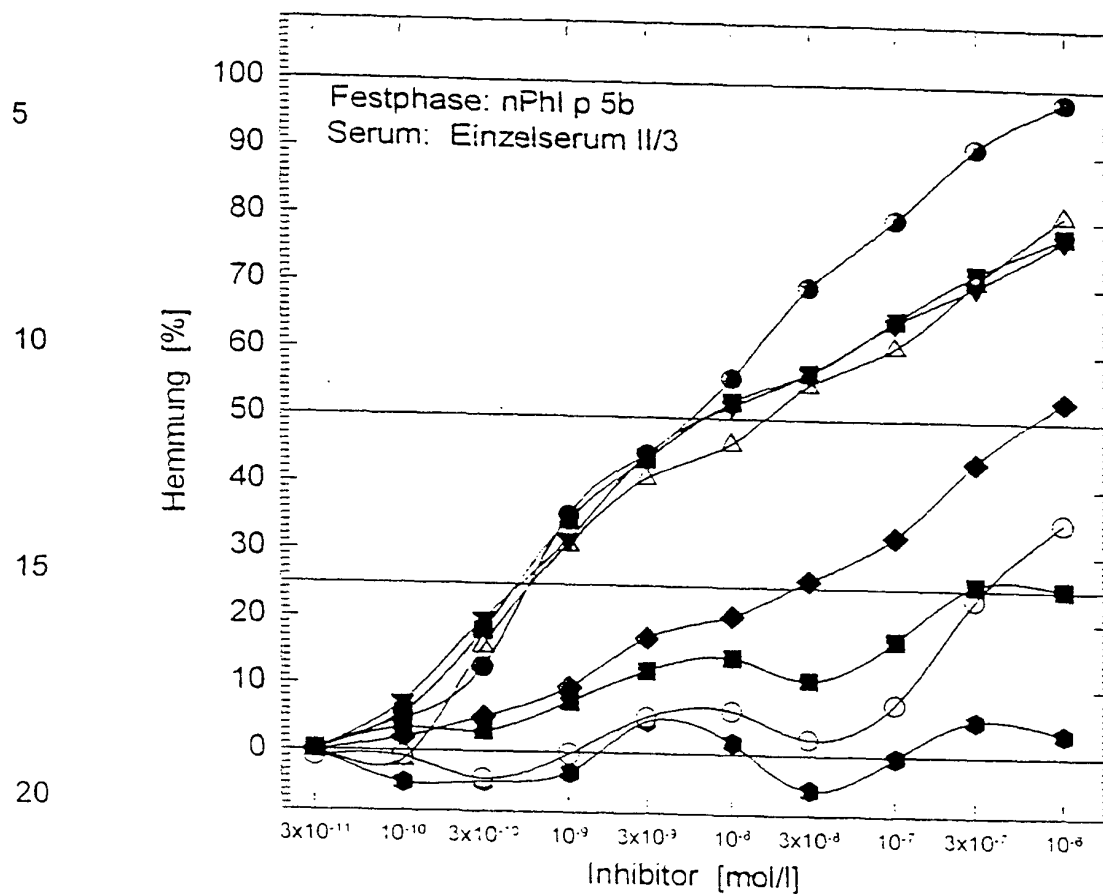
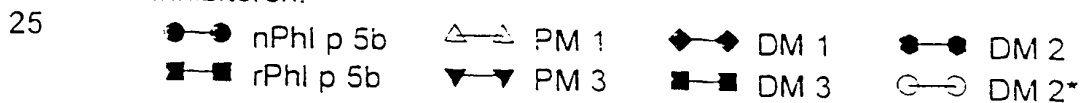


Abbildung 3 EAST - Hemmkurven der PhI p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Einzelserum II/3
Inhibitoren:



- 37 -

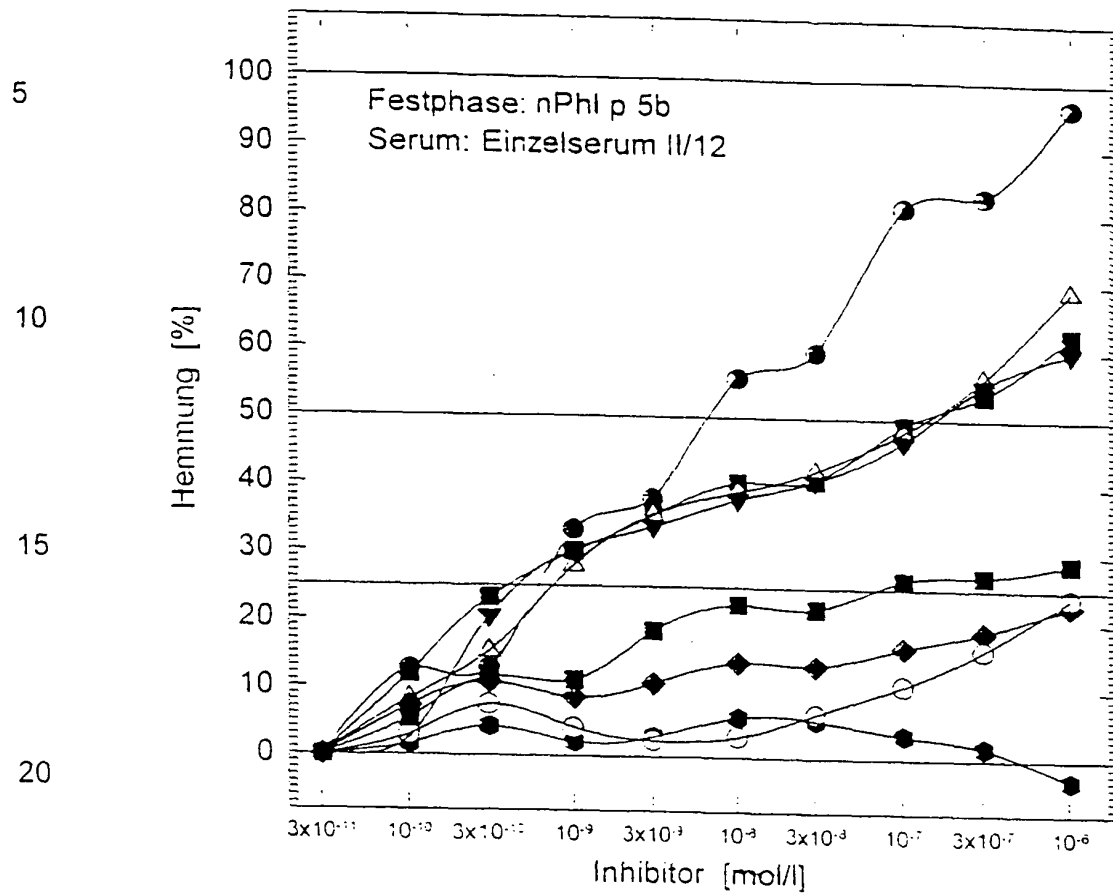


Abbildung 4 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Einzelserum II/12

Inhibitoren:

- | | | | |
|---------------|----------|----------|-----------|
| ●—● nPhl p 5b | △—△ PM 1 | ◆—◆ DM 1 | ●—● DM 2 |
| ■—■ rPhl p 5b | ▼—▼ PM 3 | ■—■ DM 3 | ○—○ DM 2* |

- 38 -

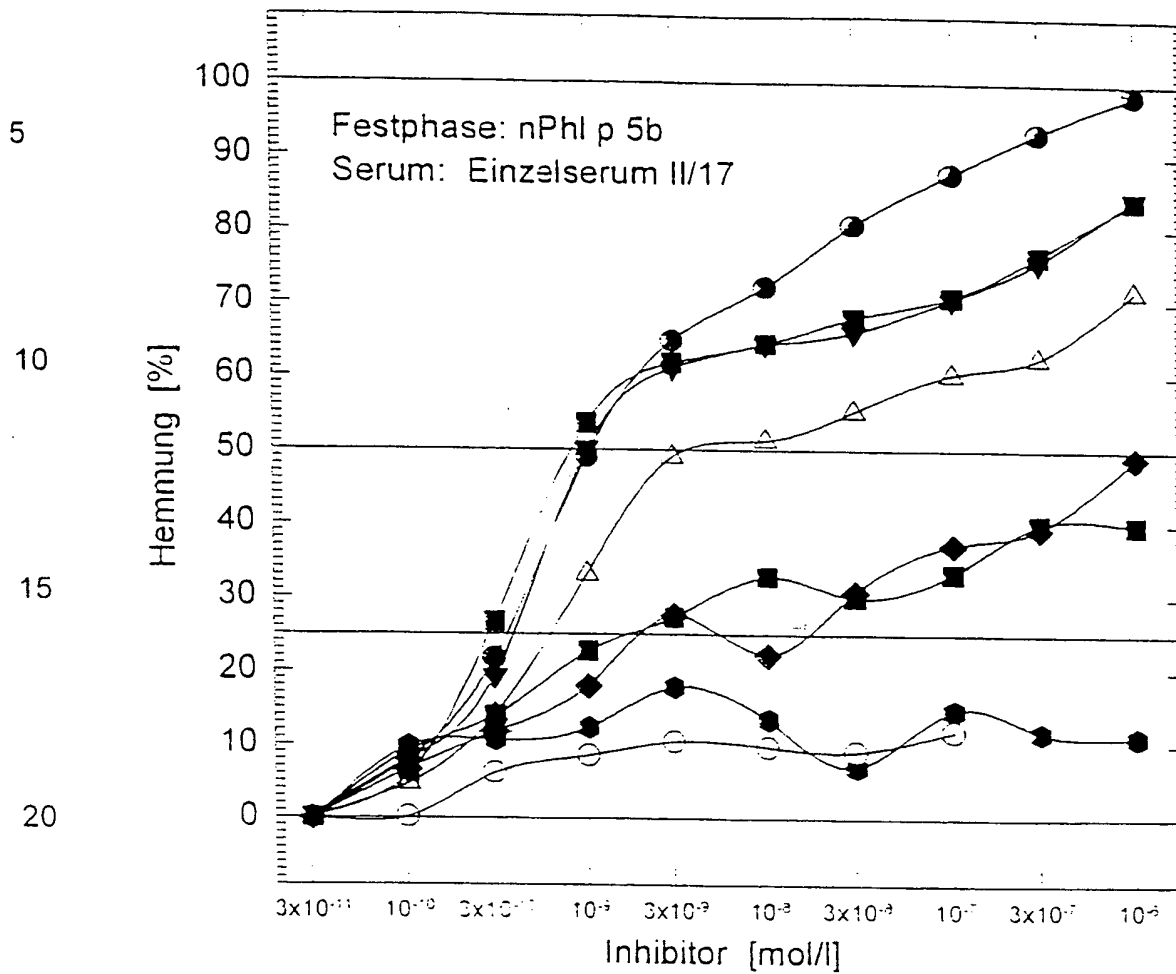


Abbildung 5 EAST - Hemmkurven der Phl p 5b - Mutanten mit dem Allergiker - Einzelserum II/17

Inhibitoren:

● nPhl p 5b

△ PM 1

◆ DM 1

● DM 2

■ rPhl p 5b

▼ PM 3

■ DM 3

○ DM 2*

Tabelle 2:

Allergene Potenz ($P_{rel.}$) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Serumpool Bor 18/100

5	Inhibitor	Hemmwert ¹ [mol/l]		Allergene Potenz($P_{rel.}$) ²	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$3,3 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$2,0 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-9}$	1,709	0,8410
15	PM1	$4,5 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-8}$	0,739	0,3490
	PM3	$2,0 \times 10^{-10}$	$4,8 \times 10^{-9}$	1,641	0,8640
	DM1	$8,6 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-8}$	0,039	0,0015
	DM2	$8,3 \times 10^{13}$	$2,3 \times 10^{38}$	$4,0 \times 10^{-23}$	$1,8 \times 10^{-45}$
	DM3	$1,2 \times 10^{-8}$	$4,1 \times 10^{-5}$	0,028	0,0001
	DM2*	$5,0 \times 10^{23}$	$2,3 \times 10^{66}$	$6,7 \times 10^{-34}$	$2,0 \times 10^{-75}$
20					

¹Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

²Allergene Potenz: relativ zu nativem Phlp5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 3:

Allergene Potenz ($P_{rel.}$) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Serumpool WE 6/97

5	Inhibitor	Hemmwert ¹ [mol/l]		Allergene Potenz($P_{rel.}$) ²	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$5,1 \times 10^{-10}$	$6,1 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$3,0 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-8}$	1,697	0,4400
15	PM1	$1,2 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-7}$	0,415	0,0510
	PM3	$8,3 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^{-8}$	0,611	0,2030
	DM1	$2,3 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-5}$	0,022	0,0004
	DM2	$1,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^{21}$	$2,6 \times 10^{-15}$	$2,3 \times 10^{-30}$
	DM3	$5,1 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-8}$	0,099	0,0020
20	DM2*	$4,6 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,001	$4,0 \times 10^{-8}$

¹Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

²Allergene Potenz: relativ zu nativem Phlp5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 4:

Allergene Potenz ($P_{rel.}$) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/3

5

	Inhibitor	Hemmwert ¹ [mol/l]		Allergene Potenz($P_{rel.}$) ²	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$5,1 \times 10^{-10}$	$5,9 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$5,6 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-8}$	0,9030	0,4190
15	PM1	$8,6 \times 10^{-10}$	$1,9 \times 10^{-8}$	0,5950	0,3140
	PM3	$5,5 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-8}$	0,9220	0,3990
	DM1	$1,2 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-8}$	0,0420	0,0035
	DM2	$6,6 \times 10^{-10}$	$5,2 \times 10^{-27}$	$7,7 \times 10^{-20}$	$1,1 \times 10^{-38}$
20	DM3	$1,1 \times 10^{-6}$	0,032	0,0004	$1,8 \times 10^{-7}$
	DM2*	$2,1 \times 10^{-6}$	0,010	0,0002	$5,9 \times 10^{-7}$

¹Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

25 ²Allergene Potenz: relativ zu nativem Phlp5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

30

35

Tabelle 5:

Allergene Potenz ($P_{rel.}$) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinantem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/12

5	Inhibitor	Hemmwert ¹ [mol/l]		Allergene Potenz($P_{rel.}$) ²	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$5,2 \times 10^{-10}$	$6,8 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$8,7 \times 10^{-10}$	$7,3 \times 10^{-8}$	0,597	0,093
15	PM1	$1,3 \times 10^{-9}$	$8,3 \times 10^{-8}$	0,391	0,082
	PM3	$1,3 \times 10^{-9}$	$9,1 \times 10^{-8}$	0,389	0,075
	DM1	$1,5 \times 10^{-5}$	68,0	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-10}$
	DM2	$3,8 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^{30}$	$1,4 \times 10^{-19}$	$1,6 \times 10^{-39}$
	DM3	$4,5 \times 10^{-8}$	0,0001	0,012	$5,7 \times 10^{-5}$
20	DM2*	196,0	$7,4 \times 10^{14}$	$2,6 \times 10^{-12}$	$9,2 \times 10^{-25}$

¹Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

²Allergene Potenz: relativ zu nativem Phlp5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

25

30

35

Tabelle 6:

Allergene Potenz ($P_{rel.}$) der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten im Vergleich zu rekombinatem und nativem Phl p 5b mit dem Allergiker-Einzelserum II/17

5

	Inhibitor	Hemmwert ¹ [mol/l]		Allergene Potenz($P_{rel.}$) ²	
		25 %	50 %	25 %	50 %
10	n Phl p 5b	$2,2 \times 10^{-10}$	$2,6 \times 10^{-9}$	1,000	1,000
	r Phl p 5b	$2,1 \times 10^{-10}$	$4,7 \times 10^{-9}$	1,045	0,5450
15	PM1	$6,4 \times 10^{-10}$	$2,2 \times 10^{-8}$	0,336	0,1190
	PM3	$2,5 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^{-9}$	0,855	0,4680
	DM1	$6,5 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-8}$	0,033	0,0010
	DM2	73,9	$6,4 \times 10^{-19}$	$2,9 \times 10^{-12}$	$4,1 \times 10^{-29}$
	DM3	$5,6 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8}$	0,038	0,0005
20	DM2*	0,0004	11675,0	$5,3 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-13}$

¹Hemmwerte: Konzentrationen d. Inhibitoren bei 25% bzw. 50% Hemmung

25 ²Allergene Potenz: relativ zu nativem Phlp5b bei 25% bzw. 50% Hemmung

Beispiel 5

30 **Reduzierte Histaminfreisetzung von Basophilen durch die rPhl p 5b-Mutanten**

35 Die hergestellte Punktmutante PM3 und die Deletionsmutanten DM1, DM2, DM2* und DM3 wurden auf ihre Fähigkeit, Histamin aus Basophilen freizusetzen, überprüft und mit dem Wildtyp rPhl p 5b verglichen.

Vor dem Histaminfreisetzungstest wurden zunächst die basophilen Leukozyten aus dem EDTA-Blut eines Allergikers (PS-W) über eine Dextran-Sedimentation angereichert und dann auf eine Endkonzentration von 100.000 Basophilen/ml eingestellt. Zur Freisetzung von Histamin aus den Basophilen wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension mit 50 µl Antigenlösung 40 min. bei 37°C inkubiert. Dazu wurde das rPhl p 5b und die Mutanten in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (von 10^{-5} - 10^{-12} M). Das freigesetzte Histamin wurde in den jeweiligen Überständen mit Hilfe des Methyl-Histamin-RIA der Fa. Pharmacia nach der Vorschrift des Herstellers bestimmt.

Alle untersuchten rekombinanten Proteine beschrieben im Histaminfreisetzungstest mit zunehmender Konzentration die typische Glockenkurve (Abb. 6). Im Vergleich zum Wildtyp rPhl p 5b zeigte die Punktmutante keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, Histamin freizusetzen. Für die Deletionsmutanten DM3, DM1 bzw. DM2 ergab sich, bei Bezug auf die Konzentration, die eine 30%ige Histaminfreisetzung bewirkt, eine Reduktion um das 3-, 20-, bzw. 500-fache. Die Deletionsmutanten zeigen also eindeutig ein vermindertes Vermögen, Histamin aus Basophilen freizusetzen.

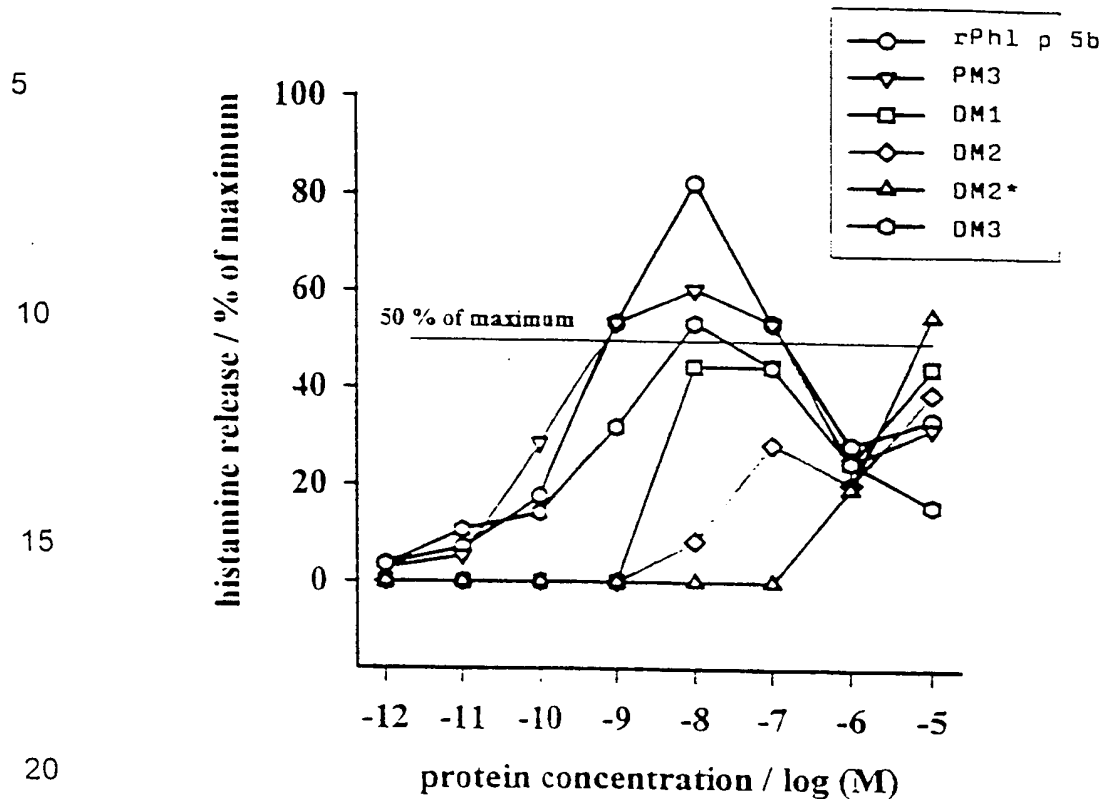
25

30

35

- 45 -

Abb. 6 Histaminfreisetzung von humanen Basophilen nach Reaktion mit den Allergenen und Allergenmutanten



Beispiel 6

Nachweis der Reaktivität von rekombinanten Phl p 5b-Mutanten mit T-Zell-Klonen von Graspollenallergikern

Die Reaktivität der rekombinanten Phl p 5b-Mutanten wurde an etablierten T-Zell-Klonen (TCC) mit bekannter Spezifität getestet. Die TCC stammen von Graspollen-Allergikern (s. Bsp. 1) und sind gegen die T-Zell-reaktiven Bereiche A (Abb. 7), B (Abb. 8) und C (Abb. 9) gerichtet. Die T-Zellreaktivität wurde durch die Stimulierung der Klone zur Proliferation gemessen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die TCC mit den Phl p 5b-Mutanten spezifisch reagieren, wenn der entsprechende Epitop unverändert ist und zeigen erwartungsgemäß keine Reaktion, wenn der Epitop fehlt oder durch eine Punktmutation verändert ist.

Abb. 7: Proliferative Reaktion von Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC) von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich A

5

10

15

20

25

30

Stimulator ¹⁾	Epitop vorhanden	[³ H]-Thymidineinbau in TCC ²⁾			
		JR 15	JR 13	CB 14	CB 2
Medium	—	—	—	—	—
n Phl p5	+	+++	+++	+++	+++
r Phl p5a	(±)	—	—	+	—
r Phl p5b	+	+++	+++	+++	+++
PM1	+	++	+++	+++	+++
PM3	+	+++	+++	+++	+++
DM1	+	+++	+++	+++	+++
DM2	+	+++	+++	ng ³⁾	ng
DM2*	—	—	—	—	—
DM3	+	+++	+++	ng	ng
PL (12mer)	+	+++	+++	+++	+++

35

¹ Endkonzentration 0.3 µM

² Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++), > 10 (+++)

³ n.g.: nicht getestet

Abb. 8: Proliferative Reaktion von Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC) von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich B

Stimulator ¹⁾	Epitop vorhanden	[³ H]-Thymidineinbau ²⁾ in TCC	
		UZH2	DW8
Medium	—	—	—
n Phl p5	+	+++	+++
r Phl p5a	(±)	±	+++
r Phl p5b	+	+++	+
PM1	+	+++	+
PM3	+	+++	±
DM1	+	+++	+
DM2	—	—	—
DM2*	—	—	—
DM3	+	+++	+
PL (12mer)	+	+++	+++

¹ Endkonzentration 0.3 µM

² Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++) , > 10 (+++)

³ n.g.: nicht getestet

Abb. 9: Proliferative Reaktion des Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Klonen (TCC)
von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

Spezifität: Immundominanter T-Zell-reaktiver Bereich C

5

10

15

20

25

30

Stimulator ¹⁾	Epitop unverändert vorhanden	[³ H]-Thymidineinbau ²⁾			
		1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	
Medium	—	1	1	1	—
n Phl p5	+	11,2	8,2	4,5	++
r Phl p5a	—	ng	<1	<1	—
r Phl p5b	+	11,0	7,0	5,5	++
PM1	—	<1	<1	1,1	—
PM3	+	7,4	5,9	4,5	++
DM1	+	8,6	6,2	4,4	++
DM2	+	14,4	9,1	7,1	+++
DM2*	+	12,8	12,1	11,7	+++
DM3	+	9,8	6,9	4,4	++
PL (12mer)	+	20,9	16,7	ng ³⁾	+++

¹ Endkonzentration 0,3 µM

² Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++) , > 10 (+++)

³ n.g.: nicht getestet

35

Beispiel 7**Testung der Reaktivität von rekombinanten Phl p 5b-Mutanten mit T-Zell-Linien von Graspollenallergikern**

5

Von 8 Graspollenallergikern (s. Bsp. 1) wurden die oligoklonalen T-Zell-Linien (TCL) durch wiederholte Aktivierung mit natürlichem Phl p 5b (a + b) oder rekombinantem rPhl p 5b bzw. 5a + 5b angelegt.

10

Diese TCL wurden mit den rPhl p 5b-Mutanten auf ihre proliferative Reaktion getestet (Abb. 10). Dabei zeigt sich, daß alle Mutanten die TCL aktivieren, wobei jedoch quantitative Unterschiede bestehen. Die Deletionsmutante DM3 zeigt bei den meisten TCL eine starke spezifische

15

20

25

30

35

Abb. 10: Proliferative Reaktion des Phl p 5b-reaktiven T-Zell-Linien (TCL)
von Allergikern mit rPhl p 5b-Mutanten

TCL	¹ H] - Thymidincinnbau in TCL ²⁾							
	1 Wäl n Phl p 5	2 Eic n Phl p 5	3 Fre n Phl p 5	4 Mer n Phl p 5	6 Mah r Phl p 5a r Phl p 5b	5 17.4 r Phl p 5	7 19.2 r Phl p 5b	8 20.1 r Phl p 5b
Primärer Stimulator	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+
Sekundärer Aktivator ³⁾	-	+	+	+	++	ng ³⁾	ng	ng
n Phl p 5	+	+	+	+	+++	+	+++	+++
r Phl p 5a	+	+	+	+	++	+	+++	+
r Phl p 5b	+	+	+	+	++	+	+++	+++
PM1	+	+	+	+	+	+	+	+
PM3	+	+	+	+	+	+	+	+
DM1	+	+	+	+	+	+	+	+
DM2	+	+	+	+	+	+	+	+
DM2*	+	+	+	+	+	+	+	+
DM3	+	+	+	+	+	+	+	+

¹ Endkonzentration 0,3 µM

² Stimulationsindex SI: < 1(-), 1-2 (+), 2-5(+), 5-10 (++) , > 10 (+++)

³ n.g.: nicht getestet

Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse gemäß der Beispiele 1 - 7

Die Kartierung der von den T-Helferzellen von Graspollen-Allergikern erkannten Epitope des Phl p 5b-Hauptallergens hat gezeigt, daß die T-Zell-Epitope der individuellen T-Zell-Klone (TCL) über die gesamte Sequenz des Phl p 5b verteilt sind. Es lassen sich jedoch **3 immundominante T-Zell-reaktive Bereiche** erkennen, die von 85% der TCC erkannt werden (Beispiel 1). Durch Punktmutationen (Beispiel 2) und Deletionsmutationen (Beispiel 3) konnten rekombinante Phl p 5b-Mutanten erzeugt werden. Die Punktmutanten (PM1 und PM3) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer IgE-Reaktivität, gemessen im EAST-Hemmtest (Beispiel 4), nur unwesentlich vom Wildtyp Phl p 5b. Die IgE-Reaktivität der Deletionsmutanten DM1 und DM3 ist stark reduziert, aber noch nachweisbar. Demgegenüber ist die IgE-Bindung der Mutanten DM2 und DM2* extrem stark reduziert. Diese graduelle Abnahme der Allergenität der rPhl p 5b-Mutanten wird auch durch den Histamin-Freisetzungstest mit Spez. IgE beladenen Basophilen aus dem Blut von Allergikern bestätigt (Beispiel 5). Die Prüfung der rPhl p 5b-Mutanten mit Epitop-kartierten T-Zell-Klonen bestätigt, daß die Punkt- und Deletionsmutationen in der erwarteten Weise mit dem TCC reagieren oder die Stimulierung nicht erfolgt (Beispiel 6). An oligoklonalen T-Zell-Linien, die aus dem Blut von Graspollenallergikern durch Stimulierung mit Phl p 5b angelegt wurden, konnte gezeigt werden, daß die Mutanten zu einer Stimulierung solcher oligoklonalen TCL fähig sind (Beispiel 7). Faßt man die Ergebnisse der Reduzierung der Allergenität und den Erhalt der T-Zell-Stimulierung zusammen, so stellen die Mutanten, besonders die Deletionsmutanten, rekombinante Allergenvarianten dar, die prospektiv zur spezifischen Immuntherapie geeignet sind.

30

35

Die nachfolgenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen:

Beispiel A: Injektionsgläser

- 5 Eine Lösung von 100 g eines Wirkstoffes oder Wirkstoffgemisches auf Basis der modifizierten rekombinanten Allergene und 5 g Dinatriumhydrogenphosphat wird in 3 l zweifach destilliertem Wasser mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.
- 10

Beispiel B: Suppositorien

- 15 Man schmilzt ein Gemisch von 20 g eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und läßt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

Beispiel C: Lösung

- 20 Man bereitet eine Lösung aus 1 g eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene, 9,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen verwendet werden.
- 25

Beispiel D: Salbe

- 30 Man mischt 500 mg eines Wirkstoffes in Form der modifizierten rekombinanten Allergene mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

Beispiel E: Tabletten

Ein Gemisch von 1 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene, 4 kg Lactose, 1.2 kg Kartoffelstärke, 0,2 kg Talk und 0,1 kg
5 Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten verpreßt, derart, daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

Beispiel F: Dragees

10 Analog Beispiel E werden Tabletten gepreßt, die anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Kartoffelstärke, Talk, Tragant und Farbstoff überzogen werden.

Beispiel G: Kapseln

15 2 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene werden in üblicher Weise in Hartgelatine kapseln gefüllt, so daß jede Kapsel 20 mg des Wirkstoffs enthält.

Beispiel H: Ampullen

20 Eine Lösung von 1 kg Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene in 60 l zweifach destilliertem Wasser wird steril filtriert, in Ampullen abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril
25 verschlossen. Jede Ampulle enthält 10 mg Wirkstoff.

Beispiel I: Inhalations-Spray

30 Man löst 14 g Wirkstoff in Form der modifizierten rekombinanten Allergene in 10 l isotonischer NaCl-Lösung und füllt die Lösung in handelsübliche Sprühgefäße mit Pump-Mechanismus. Die Lösung kann in Mund oder Nase gesprüht werden. Ein Sprühstoß (etwa 0,1 ml) entspricht einer Dosis von etwa 0,14 mg.

35

Patentansprüche

- 5 1. Modifizierte rekombinante Allergene (mrA) abgeleitet von Allergenen, die durch Extraktion aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden können und/oder ihre physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate.
- 10 2. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß diese von den Hauptallergenen der Gruppen 1-6 abgeleitet werden.
- 15 3. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern eliminiert oder reduziert ist, wobei die Reaktivität mit T-Lymphozyten weiterhin erhalten ist.
- 20 4. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene der Allergene durch gentechnische Verfahren so modifiziert werden, daß die von ihnen codierten Polypeptide Austausche, Deletionen und/oder Additionen einzelner oder mehrerer Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.
- 25 5. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß dominierende T-Zell-reaktive Bereiche (T-Zell-Epitope) von den Allergenen nicht gentechnisch verändert werden.
- 30 6. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese von Hauptallergenen der Gruppe 5 abgeleitet werden.
- 35

7. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese von dem Hauptallergen Phl p 5b abstammen.
- 5 8. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer oder eine Kombinationen der Bereiche 16-42, 135-149 und 180-206 des aus insgesamt 265 Aminosäuren bestehenden Phl p 5b-Polypeptides nicht verändert werden.
- 10 9. Modifizierte rekombinante Allergene gemäß Anspruch 8, ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Polypeptiden
 - 15 PM ($N^{32} \rightarrow D$, $D^{49} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$)
 - PM2 ($D^{49} \rightarrow L$, $K^{50} \rightarrow A$)
 - PM3 ($A^{13} \rightarrow C$)
 - DM1 ($\Delta K^{50} \rightarrow P^{\Delta 32}$, $D^{49} \rightarrow L$)
 - DM 2 ($\Delta F^{51} - G^{178}$, $D^{49} - L$, $K^{50} - A$)
 - 20 DM2* ($\Delta F^{51} - G^{178}$, 179 - 217 veränderte Sequenz)
 - DM3 ($\Delta A^{154} - T^{177}$, $A^{220} \rightarrow T$)
- 25 10. Verfahren zur Herstellung von modifizierter rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1 bis 9 und/oder ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Varianten der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet werden.
- 30 11. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend ein oder mehrere modifizierte rekombinante Allergene gemäß der Ansprüche 1-9 und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate sowie gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von IgE-vermittelten Allergien.

- 5 12. Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens ein modifiziertes rekombinantes Allergen gemäß der Ansprüche 1-9 und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.
- 10 13. Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene und/oder eines ihrer physiologischen unbedenklichen Salze oder Solvate gemäß der Ansprüche 1-9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immunspezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien.
- 15 14. Verwendung der modifizierten rekombinanten Allergene gemäß der Ansprüche 1-9 zur immunspezifischen Therapie (Hyposensibilisierung) von Allergien.

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6: C07K14/415, A61K39/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 : C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MÜLLER, W.D. ET AL.: "Group 5 allergens of timothy grass ..." INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL., volume. 109, 1996. pages 352-355, XP002077934 *page 352, right-hand column; figure 2; page 355*	9-13
A	WO 91 06571 A (IMMUNOLOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 16 May 1991 (16.05.91) *Pages 3-5; table 2; claims 6-22*	9-13
A	WO 94 04564 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 3 March 1994 (03.03.94) *Page 9; Page 20; claims 1-17*	9-13
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 September 1998 (18.09.98)

Date of mailing of the international search report

23 October 1998 (23.10.98)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01507

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BECKER, W.M.: "Molekulare Charakterisierung von Allergenen" IMMUN. INFEKT., volume 22, 1994, pages 82-87, XP002077935 *table 1; Page 86* -----</p>	9-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01507

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: **1-8**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Although Claim 14 relates to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

Claim No.: 14

Rule 39.1(iv) PCT- methods for treatment of the human or animal body

Claims No.: 1-8

Claims 1-2 do not provide any characteristic technical information;

Claims 3-8 additionally indicate only the result to be achieved;

Claim 5 and 8 additionally explain which characteristics should NOT be present.

None of the above-mentioned Claims describes the way in which the (known!!) antigen has been modified, leading to a technical effect. A POSITIVE technical (structural) characteristic causally leading to the desired technical effect should be given in this case in order to carry out a meaningful search.

See also PCT Regulations concerning Search, C-III 2.1, 2.3, 3.6, 3.7, 3.12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01507

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9106571	A	16-05-1991	AU 650249 B 16-06-1994
			AU 6733090 A 31-05-1991
			CA 2073045 A 04-05-1991
			EP 0500785 A 02-09-1992
			FI 921979 A 30-04-1992
			JP 5502445 T 28-04-1993
			US 5328991 A 12-07-1994
			US 5547669 A 20-08-1996
WO 9404564	A	03-03-1994	AU 679455 B 03-07-1997
			AU 4691693 A 15-03-1994
			CA 2142370 A 03-03-1994
			EP 0656012 A 07-06-1995
			FI 950602 A 10-02-1995
			JP 8500349 T 16-01-1996
			NO 950526 A 11-04-1995
			US 5736362 A 07-04-1998
			US 5721119 A 24-02-1998

PCT/EP 98/01507

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ternationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01507

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BECKER, W.M.: "Molekulare Charakterisierung von Allergenen" IMMUN. INFEKT., Bd. 22, 1994, Seiten 82-87, XP002077935 *Tab. 1; S. 86 *</p> <p>-----</p>	9-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/01507

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. **14**
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. **1-8**
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl Anspruch 14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Ansprüche Nr.: 14

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

Ansprüche Nr.: 1-8

Ansprüche 1-2 geben keinerlei charakteristische technische Information; Ansprüche 3-8 geben zusätzlioh nur das zu erzielende Resultat an; Ansprüche 5 und 8 führen zusätzlich aus, welche Merkmale NICHT vorhanden sein sollen.

Keiner der genannten Ansprüche beschreibt die Art der Modifikation am (bekannten !!) Antigen, die zu einem technischen Effekt führt. Für eine sinnvolle Recherche ist in diesem Fall ein POSITIVES technisches (strukturelles) Merkmal anzugeben, das ursächlich zu dem gewünschten technischen Effekt führt.

Siehe auch PCT-Richtlinien für die Recherche, C-III 2.1, 2.3, 3.6, 3.7, 3.12.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01507

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9106571 A	16-05-1991	AU 650249 B	16-06-1994
		AU 6733090 A	31-05-1991
		CA 2073045 A	04-05-1991
		EP 0500785 A	02-09-1992
		FI 921979 A	30-04-1992
		JP 5502445 T	28-04-1993
		US 5328991 A	12-07-1994
		US 5547669 A	20-08-1996
WO 9404564 A	03-03-1994	AU 679455 B	03-07-1997
		AU 4691693 A	15-03-1994
		CA 2142370 A	03-03-1994
		EP 0656012 A	07-06-1995
		FI 950602 A	10-02-1995
		JP 8500349 T	16-01-1996
		NO 950526 A	11-04-1995
		US 5736362 A	07-04-1998
		US 5721119 A	24-02-1998